

# Neue 5-Aminolävulinsäureester in Tumorthherapie und Tumordiagnostik

## Systematische Synthese und zellbiologische Testung

Dissertation zur Erlangung  
des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)  
der Naturwissenschaftlichen Fakultät IV–Chemie und Pharmazie  
der Universität Regensburg



vorgelegt von  
Florian Hausmann  
aus Burghausen

2002

Die vorliegende Arbeit entstand von September 2000 bis Dezember 2002 am Lehrstuhl von Prof. Dr. H. Brunner, Institut für Anorganische Chemie der Universität Regensburg.

Die zellbiologische Testung wurde am Institut für Pathologie der Universität Regensburg im Arbeitskreis von Prof. Dr. R. Knüchel-Clarke durchgeführt, der ich für das sehr angenehme freundschaftliche Arbeitsklima, die optimalen Arbeitsbedingungen und die vielen fachlichen Diskussionen danken möchte.

Meinem hochgeschätzten Lehrer

**Herrn Prof. Dr. Henri Brunner**

danke ich für die interdisziplinäre Themenstellung am Schnittpunkt von Anorganischer, Organischer und Medizinischer Chemie, sein stetes Interesse am Fortgang dieser Arbeit, das mir entgegengebrachte uneingeschränkte Vertrauen und die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen.

**Für Marion**

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 DIE KRANKHEIT KREBS.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 KARZINOGENE.....</b>	<b>2</b>
<b>1.3 KREBSSTERBESTATISTIK.....</b>	<b>3</b>
<b>1.4 PHOTODYNAMISCHE TUMORTHERAPIE (PDT) UND -DIAGNOSTIK (PDD).....</b>	<b>5</b>
1.4.1 Prinzip .....	5
1.4.2 Historische Entwicklung.....	6
1.4.3 Photosensibilisatoren.....	7
1.4.4 Klinische Anwendung der PDT und der PDD .....	10
<b>1.5 5-AMINOLÄVULINSÄURE (ALA) IN PDT UND PDD.....</b>	<b>10</b>
1.5.1 PPIX-Biosynthese.....	10
1.5.2 Klinische Anwendung .....	14
1.5.3 Marktpotenzial .....	15
<b>1.6 KARZINOME DES GASTROINTESTINALTRAKTS.....</b>	<b>16</b>
1.6.1 Ösophaguskarzinom .....	17
1.6.2 Magenkarzinom.....	17
1.6.3 Kolonkarzinom.....	18
<b>1.7 UROTHELKRZINOM.....</b>	<b>19</b>
<b>1.8 KLINISCHE STUDIEN: VOM ZELLTEST ZUR ZULASSUNG .....</b>	<b>19</b>
 <b>2 GRUNDGEDANKEN UND ZIELVORSTELLUNG .....</b>	 <b>21</b>
 <b>3 5-AMINOLÄVULINSÄUREDERIVATE IN PDT UND PDD .....</b>	 <b>23</b>
<b>3.1 DERIVATISIERUNGSSTRATEGIEN.....</b>	<b>23</b>
<b>3.2 TRANSPORTMECHANISMUS DURCH DIE ZELLMEMBRAN .....</b>	<b>24</b>

<b>3.3 5-AMINOLÄVULINSÄUREESTER.....</b>	<b>26</b>
<b>3.4 ALA-DEHYDROGENASE.....</b>	<b>27</b>
<b>3.5 SYNTHESEPLANUNG.....</b>	<b>29</b>
3.5.1 Synthese von 5-Aminolävulinsäureestern mit Thionylchlorid .....	31
3.5.2 Schutz der Aminofunktion von 5-Aminolävulinsäure .....	32
3.5.3 Veresterung durch EDC-Kupplung .....	33
3.5.4 Synthese von 5-Aminolävulinsäureoligoestern.....	35
3.5.5 Synthese von 5-Aminolävulinsäure-Diaminoderivaten .....	38
3.5.5.1 Synthese von BOC-geschützten Diaminoverbindungen.....	38
3.5.5.2 Synthese von 5-Aminolävulinsäure-1,3-diaminopropylestern.....	40
3.5.5.3 Kupplung von 5-Aminolävulinsäureestern mit Diaminocarbonsäuren.....	41
<b>4 SPEKTROSKOPISCHE UNTERSUCHUNGEN .....</b>	<b>43</b>
<b>4.1 MASSENSPEKTROSKOPIE.....</b>	<b>43</b>
<b>4.2 KERNRESONANZSPEKTROSKOPIE.....</b>	<b>43</b>
<b>5 MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>49</b>
<b>5.1 GRUNDLAGEN DER ZELLKULTUR .....</b>	<b>49</b>
5.1.1 <i>In vitro</i> -Modelle .....	49
5.1.2 Methoden der Kultivierung.....	50
<b>5.2 ABSORPTIONS- UND EMISSIONSSPEKTRUM VON PPIX.....</b>	<b>51</b>
<b>5.3 DURCHFLUSSZYTOMETRIE .....</b>	<b>52</b>
5.3.1 Prinzip .....	52
5.3.2 Lichtdetektion.....	53
5.3.3 FACS-Messungen.....	54
5.3.3.1 Probenvorbereitung .....	54
5.3.3.2 Geräteparameter .....	54
5.3.3.3 Auswertung der FACS-Daten .....	55
<b>5.4 MTT-TEST.....</b>	<b>57</b>
<b>5.5 QUANTIFIZIERUNG DER PHOTOTOXIZITÄT .....</b>	<b>58</b>
5.5.1 Durchführung .....	58

5.5.2 Klonogenitätstest.....	59
<b>6 AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE.....</b>	<b>60</b>
<b>6.1 DURCHFLUSSZYTOMETRISCHES SCREENING.....</b>	<b>60</b>
<b>6.2 DUNKELTOXIZITÄTSTEST.....</b>	<b>63</b>
<b>6.3 ZEITABHÄNGIGES SCREENING.....</b>	<b>66</b>
<b>6.4 TUMORSELEKTIVE PPIX-AKKUMULATION.....</b>	<b>69</b>
<b>6.5 PHOTOTOXIZITÄT.....</b>	<b>71</b>
<b>6.6 AUSBLICK.....</b>	<b>75</b>
<b>7 EXPERIMENTELLER TEIL.....</b>	<b>76</b>
<b>7.1 GRUNDLAGEN.....</b>	<b>76</b>
7.1.1 Arbeitsbedingungen.....	76
7.1.2 Analytik.....	77
<b>7.2 ALLGEMEINE ARBEITSVORSCHRIFTEN .....</b>	<b>79</b>
7.2.1 AAV 1: Veresterung mit Thionylchlorid.....	79
7.2.2 AAV 2: Einführung von BOC-Schutzgruppen.....	79
7.2.3 AAV 3: Veresterung mit EDC .....	80
7.2.4 AAV 4: Abspaltung von BOC-Schutzgruppen.....	81
<b>7.3 SYNTHESE DER STANDARDVERBINDUNGEN .....</b>	<b>81</b>
7.3.1 5-Aminolävulinsäurehexylester-hydrochlorid 2 .....	81
7.3.2 5-Aminolävulinsäurebenzylester-hydrochlorid 3 .....	82
<b>7.4 5-AMINOLÄVULINSÄURETHIOESTER .....</b>	<b>83</b>
7.4.1 BOC-5-Aminolävulinsäurethiohexylester .....	83
7.4.2 5-Aminolävulinsäurethiohexylester-hydrochlorid 21 .....	84
<b>7.5 5-AMINOLÄVULINSÄUREPHENYLESTER .....</b>	<b>85</b>
7.5.1 BOC-5-Aminolävulinsäurephenylester.....	85
7.5.2 5-Aminolävulinsäurephenylester-hydrochlorid 16.....	85
<b>7.6 5-AMINOLÄVULINSÄUREOXAALKYLESTER.....</b>	<b>86</b>
7.6.1 5-Aminolävulinsäure-3-oxabutylester-hydrochlorid 4 .....	86

7.6.2 5-Aminolävulinsäure-3-oxapentylester-hydrochlorid 5 .....	87
7.6.3 5-Aminolävulinsäure-5-oxahexylester-hydrochlorid 6 .....	88
7.6.4 5-Aminolävulinsäure-3,6-dioxaheptylester-hydrochlorid 7 .....	88
<b>7.7 SYNTHES N-GESCHÜTZTER 5-AMINOLÄVULINSÄURE .....</b>	<b>89</b>
7.7.1 BOC-5-Aminolävulinsäure 10 .....	89
7.7.2 5-Aminolävulinsäurephthalimid 11 .....	90
<b>7.8 SYNTHES SUBSTITUIERTER 5-AMINOLÄVULINSÄUREBENZYLESTER .....</b>	<b>92</b>
7.8.1 5-Aminolävulinsäure-p-fluorbenzylester-hydrochlorid 8 .....	92
7.8.2 BOC-5-Aminolävulinsäure-p-trifluormethylbenzylester .....	92
7.8.3 5-Aminolävulinsäure-p-trifluormethylbenzylester-hydrochlorid 12 .....	93
7.8.4 BOC-5-Aminolävulinsäure-2,3,4,5-tetrafluorbenzylester .....	94
7.8.5 5-Aminolävulinsäure-2,3,4,5-tetrafluorbenzylester-hydrochlorid 13 .....	95
7.8.6 BOC-5-Aminolävulinsäurepentafluorbenzylester .....	96
7.8.7 5-Aminolävulinsäurepentafluorbenzylester-hydrochlorid 14 .....	96
7.8.8 BOC-5-Aminolävulinsäure-p-nitrobenzylester .....	97
7.8.9 5-Aminolävulinsäure-p-nitrobenzylester-hydrochlorid 15 .....	98
<b>7.9 SYNTHES FLUORIERTER 5-AMINOLÄVULINSÄUREALKYLESTER .....</b>	<b>99</b>
7.9.1 BOC-5-Aminolävulinsäure-1H,1H-heptafluorbutylester .....	99
7.9.2 5-Aminolävulinsäure-1H,1H-heptafluorbutylester-hydrochlorid 17 .....	100
7.9.3 BOC-5-Aminolävulinsäure-1H,1H,5H-octafluorpentylester .....	100
7.9.4 5-Aminolävulinsäure-1H,1H,5H-octafluorpentylester-hydrochlorid 18 .....	101
7.9.5 BOC-5-Aminolävulinsäure-1H,1H,2H,2H-nonafluorhexylester .....	102
7.9.6 5-Aminolävulinsäure-1H,1H,2H,2H-nonafluorhexylester-hydrochlorid 19 .....	103
7.9.7 BOC-5-Aminolävulinsäure-1H,1H-tridecafluorheptylester .....	104
7.9.8 5-Aminolävulinsäure-1H,1H-tridecafluorheptylester-hydrochlorid 20 .....	105
<b>7.10 SYNTHES VON 5-AMINOLÄVULINSÄUREOLIGOESTERN .....</b>	<b>106</b>
7.10.1 Di-BOC-bis-5-aminolävulinsäureethylenglykoldiester .....	106
7.10.2 Bis-5-aminolävulinsäureethylenglykoldiester-dihydrochlorid 22 .....	107
7.10.3 Di-BOC-bis-5-aminolävulinsäure-1,4-dibenzylidiester .....	107
7.10.4 Bis-5-aminolävulinsäure-1,4-dibenzylidiester-dihydrochlorid 23 .....	108
7.10.5 Tetra-BOC-tetrakis-5-aminolävulinsäurepentaerythritoltetraester .....	109

7.10.6 Tetrakis-5-aminolävulinsäurepentaerythrityltetraester-tetrahydrochlorid 24 .....	110
<b>7.11 SYNTHESE VON 5-AMINOLÄVULINSÄUREDIAMINOPROPYLESTERN .....</b>	<b>111</b>
7.11.1 1,3-Di-BOC-diamino-2-propanol.....	111
7.11.2 BOC-5-Aminolävulinsäure-1,3-di-BOC-diamino-2-propylester .....	112
7.11.3 5-Aminolävulinsäure-1,3-diamino-2-propylester-trihydrochlorid 25 .....	112
7.11.4 5-Phthalimidolävulinsäure-1,3-di-BOC-diamino-2-propylester.....	113
7.11.5 5-Phthalimidolävulinsäure-1,3-diamino-2-propylester-dihydrochlorid 26 .....	114
<b>7.12 SYNTHESE VON DIAMINOSÄUREAMIDEN MIT 5-AMINOLÄVULINSÄURE- ESTERN ALS AMINKOMPONENTE.....</b>	<b>115</b>
7.12.1 5-Aminolävulinsäuremethylester-hydrochlorid 9 .....	115
7.12.2 Di-BOC-2,3-diaminopropionsäure .....	116
7.12.3 Di-BOC-3,4-diaminobenzoessäure .....	117
7.12.4 2,3-Di-BOC-diaminopropionsäure-N-methyl-5-aminolävulinatylamid .....	118
7.12.5 2,3-Di-BOC-diaminopropionsäure-N-benzyl-5-aminolävulinatylamid .....	119
7.12.6 3,4-Di-BOC-diaminobenzoessäure-N-methyl-5-aminolävulinatylamid.....	120
7.12.7 3,4-Diaminobenzoessäure-N-methyl-5-aminolävulinatylamid-dihydro- chlorid 27 .....	120
<b>8 ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>122</b>
<b>8.1 HINTERGRUND.....</b>	<b>122</b>
<b>8.2 SYNTHESE.....</b>	<b>123</b>
<b>8.3 ZELLBIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN.....</b>	<b>127</b>
8.3.1 <i>In vitro</i> -Modelle .....	127
8.3.2 Durchflusszytometrisches Screening.....	128
8.3.3 Tumorselektive PPIX-Akkumulation und Phototoxizität .....	130
<b>8.4 FAZIT .....</b>	<b>130</b>
<b>9 LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>132</b>
<b>10 DANK .....</b>	<b>138</b>



# 1 Einleitung

## 1.1 Die Krankheit Krebs

Kaum eine andere Krankheit gibt den Forschern noch immer so viele Rätsel auf wie die Krankheit Krebs. Jahrzehntelange Forschung auf dem Gebiet der Prävention, Diagnostik und Therapie haben dazu geführt, dass derzeit etwa jeder zweite Krebskranke fünf Jahre nach der ersten Diagnose noch lebt. Aber gleichzeitig werden jedes Jahr in Europa fast vier Millionen neue Krebsfälle diagnostiziert. Mit etwa 750 000 Todesfällen ist Krebs nach Herz-Kreislauferkrankungen die zweithäufigste Todesursache in der Europäischen Union. Derzeit erkrankt jeder dritte Europäer noch vor seinem 75. Lebensjahr an Krebs. Dass diese Krankheit den Bemühungen der Forscher einen derartigen Widerstand entgegensetzt, liegt hauptsächlich an ihrer außerordentlichen Komplexität. Heute kennen wir über 100 verschiedene Krebsarten, die sich von unterschiedlichen Ausgangszellen des Körpers ableiten lassen und oft deutlich voneinander unterscheidbare Krankheitsbilder und Verläufe zeigen<sup>[1]</sup>. Doch alle beruhen auf Fehlfunktionen von Körperzellen, das heißt auf Veränderungen derjenigen Gene, die das Wachstums- und Teilungsverhalten der betroffenen Zellen steuern. Diese Fehlfunktionen werden durch Zellteilung an nächste Generationen weitergegeben. So kann aus einer einzigen entarteten Zelle eine Ansammlung in Form eines Tumors (Geschwulst) entstehen, der die Funktion der betroffenen Organe stark beeinflusst. Zudem können solche Krebszellen auch über das Blut- oder das Lymphsystem in andere Körperregionen vordringen, was zu Metastasenbildung führt<sup>[2]</sup>. Krebszellen unterscheiden sich in drei wichtigen Punkten von gesunden Zellen: Einerseits sind sie bei Wachstum und Zellteilung weniger beschränkt als normale Zellen, die einer strengen Regulation unterworfen sind. Andererseits differenzieren sich Krebszellen nicht in normaler Art und Weise und üben somit auch nicht die ihnen vorbestimmten Funktionen aus. Drittens sterben Krebszellen nicht nach Programm ab, das heißt, sie wuchern unkontrolliert weiter und beeinträchtigen so die Aktivität des gesunden Gewebes. Diese ungehemmte Vermehrung führt in der Regel zum Tode der betroffenen Person.

Was veranlasst eine normale Zelle dazu, zu einer Krebszelle zu mutieren? Oder anders gefragt: Wie entsteht Krebs? Um diese Frage beantworten zu können, muss man die

Erklärung auf molekularer Ebene suchen. Ausgehend von den Organen gelangt man über einzelne Zellen und subzelluläre Organellen schließlich zu den Genen. Krebs entsteht durch Mutation von Genen, die das Wachstum, die Teilung, die Differenzierung und die Lebensdauer normaler Zellen kontrollieren. Das Verständnis dieser Kontrollmechanismen und deren möglicher Aufhebung ist von essenzieller Bedeutung<sup>[3]</sup>.

## 1.2 Karzinogene

Genauso mannigfaltig wie die Erscheinungsformen und Krankheitsbilder von Krebs sind auch seine Ursachen<sup>[4]</sup>. Die Karzinogenese wird heute als mehrstufiger, über Jahre oder Jahrzehnte verlaufender Prozess verstanden. Man unterscheidet hierbei zwischen physikalischen Faktoren (ionisierende **Strahlung** wie  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - und Röntgenstrahlung, Anteile der UV-Strahlung<sup>[5]</sup>) sowie **Viren**<sup>[6]</sup> und **chemischen Karzinogenen**<sup>[7]</sup>. Bei zu großer Strahlungsexposition über längere Zeiträume können bestimmte Mutationen der Nucleotidsequenz auftreten. Wenn diese Mutationen Gene betreffen, die für die normale Zelldifferenzierung und Teilung nötig sind, so kann eine Krebszelle entstehen. Auch virale oder nichtvirale Infektionen stehen im Verdacht, Krebs auslösen zu können. Onkogene Viren töten ihre Wirtszelle nicht ab, sondern verändern deren genetisches Programm, sodass die normalen Kontrollmechanismen zur Zellteilung und Differenzierung unterbrochen werden. Eine Reihe chemischer Verbindungen kann beim Menschen Krebs verursachen. Doch liegt zwischen dem ersten mehr oder weniger dauerhaften Kontakt mit dem karzinogenen Stoff und der Krebsentstehung oftmals eine relativ lange Zeitspanne. Diese zeitliche Verzögerung beruht auf der Tatsache, dass bei der Krebsentstehung zwei wichtige Schritte eine Rolle spielen: Zunächst wird eine Zelle durch eine zeitlich begrenzte Dosis oder sogar Einzeldosis initiiert. Solche Initiierungen als Folge von Mutationen sind irreversibel und bei der Zellteilung wird diese Eigenschaft weitergegeben. Solche initiierte Zellen sind jedoch noch keine Krebszellen. Erst beim Eintreten eines weiteren Prozesses, der so genannten Promotion, entsteht aus einer initiierten Zelle eine Krebszelle. Man kann folglich zwischen Initiatoren und Promotoren unterscheiden. Stoffe, die sowohl Initiatoren als

auch Promotoren sind, bezeichnet man als komplette Karzinogene. So enthält Zigarettenrauch als komplexes Gemisch von über 6000 Verbindungen außer bekannten toxischen Substanzen wie Cyaniden, Kresolen und radioaktiven Elementen (Thorium-228, Radium-226, Polonium-210) auch über 50 verschiedene, nachgewiesenermaßen karzinogene Verbindungen (Arsen, Phenanthrene, Nitroso-Verbindungen, Nitrosamine, etc.). Da sowohl viele Initiatoren als auch Promotoren enthalten sind, kann Tabakrauch als idealer Nährboden für Krebs angesehen werden. So ist es nicht verwunderlich, dass bei Rauchern das Risiko, an Krebs zu erkranken, erheblich gesteigert ist. Dabei handelt es sich nicht nur um Lungenkrebs und Krebs im Mundbereich (Lippe, Zunge, Kehlkopf, Mundhöhle, Rachen), sondern auch um Krebserkrankungen anderer Organe wie Speiseröhre, Bauchspeicheldrüse oder Harnblase. Somit hätten in Deutschland 1995 bis zu 46 000 Krebstodesfälle durch Aufgabe des Rauchens vermieden werden können. Allein an Lungenkrebs starben 26000 Männern und 5 000 Frauen<sup>[8]</sup>.

### 1.3 Krebssterbestatistik<sup>[9]</sup>

Nach den Herz-Kreislauferkrankungen rangiert Krebs an zweiter Stelle aller krankheitsbedingten Todesursachen. Zur Zeit stirbt ungefähr jeder Dritte an einer Erkrankung des Kreislaufsystems und jeder Vierte an Krebs. Da die altersbereinigte Sterblichkeit an Krankheiten des Kreislaufsystems seit Jahrzehnten erheblich abgenommen hat und auch noch weiter abnimmt, muss damit gerechnet werden, dass in etwa 15 bis 20 Jahren Krebs zur häufigsten Todesursache in Deutschland wird. Bestimmte Krebserkrankungen dominieren dabei die Krebssterbestatistik. Diesen sollte daher eine besondere Aufmerksamkeit zuteil werden. In Abbildung 1 sind die altersstandardisierte Mortalitätsrate (erste Zahlenangabe) und die am häufigsten auftretenden Krebstodesursachen (zweite Zahlenangabe) in Deutschland im Jahr 1999 dargestellt. Bei Männern ist Lungenkrebs mit 26.2% die häufigste zum Tode führende Krebserkrankung, bei Frauen ist dies Brustkrebs mit 20.2%. Die zweithäufigste Krebs-Todesursache ist bei beiden Geschlechtern Darmkrebs mit 12.1% bzw. 13.1%. Für Männer ist Prostatakrebs zur dritthäufigsten Todesursache unter den bösartigen Neubildungen geworden.

Nach einem dramatischen Anstieg ist mittlerweile Lungenkrebs die dritthäufigste Krebstodesursache bei Frauen. Trotz eines anhaltenden Rückgangs der Sterblichkeit rangiert Magenkrebs mit einem Anteil von 6.3% bei Männer auf Platz vier bzw. mit 5.3% bei Frauen auf Platz sechs. Blasenkrebs ist die Todesursache für 3.3% der männlichen und für 1.5% der weiblichen Patienten.

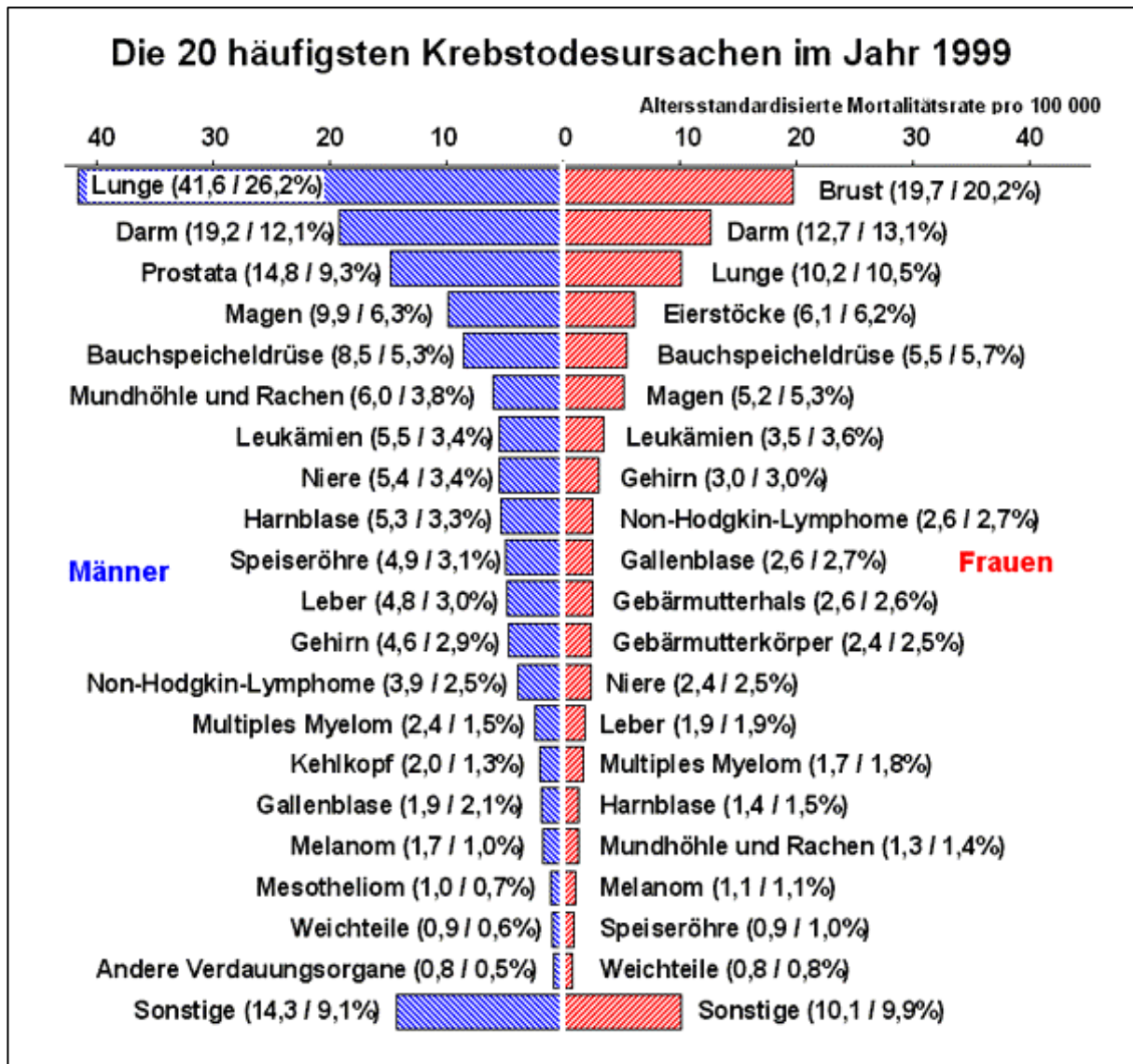


Abbildung 1: Krebssterbestatistik der Bundesrepublik Deutschland 1999<sup>[9]</sup>

Obwohl weltweit sehr große Anstrengungen auf dem Gebiet der Krebsforschung unternommen werden und besonders die Entwicklung im Bereich der Genetik große Hoffnungen geweckt hat, ist es dennoch sehr fraglich, ob man die Krankheit Krebs

jemals vollständig besiegen wird. Beim erfolgreichen Kampf gegen Krebs spielt die Interdisziplinarität der Forschung eine Schlüsselrolle. Die Integration zwischen Grundlagen- und klinischer Forschung sowie die Integration zwischen den verschiedenen Fachgebieten (Onkologie, Genetik, Chemie, Biochemie, Physik usw.), die an der Entwicklung neuer Therapien mitwirken, ist essenziell für eine sinnvolle Arzneimittelforschung. Das Ziel einer raschen Umsetzung der Grundlagenforschung in klinische Anwendungen hat heute höchste Priorität, da die Patienten Anrecht auf den Zugang zu wissenschaftlichem Fortschritt haben und Langsamkeit im internationalen wettbewerbsorientierten Kontext von großem Nachteil ist.

## **1.4 Photodynamische Tumorthherapie (PDT) und -diagnostik (PDD)**

### **1.4.1 Prinzip**

Neben den klassischen Behandlungsmethoden wie der Chemo- und der Strahlentherapie stellt die Photodynamische Therapie (PDT) eine weitere interessante und zukunfts-trächtige Behandlungsform bei Krebs dar. Hierbei wird nach Aufnahme und Anreicherung eines tumorselektiven Photosensibilisators mit sichtbarem Licht geeigneter Wellenlänge (Rotlicht) bestrahlt. Im Zusammenspiel mit Sauerstoff werden entsprechende Photoreaktionen ausgelöst, die zur Bildung von Singulett-Sauerstoff führen, der wiederum im Tumor Zellschädigungen und anschließend Nekrose verursacht<sup>[10]</sup>. Der Vorteil dieser sehr schonenden und selektiven Methode ist, dass die verwendeten Photosensibilisatoren im Gegensatz zu anderen Chemotherapeutika keinerlei Dunkeltoxizität besitzen und ihre zerstörerische Wirkung bei minimaler Schädigung des umliegenden Normalgewebes erst durch die Bestrahlung induziert wird. Eine weitere Möglichkeit, die im Tumorgewebe angereicherten Photosensibilisatoren zu nützen, stellt die Photodynamische Tumordiagnostik (PDD) dar, mit deren Hilfe man entartete Zellen schon in sehr frühem Stadium sichtbar machen kann. Somit können die tumorlokalisierenden Eigenschaften des Photosensibilisators nach Fluoreszenzanregung zur Detektion von

Tumorstadien sowie von Tumorgrenzen genutzt werden. Für eine Reihe von Krebsarten ist nachgewiesen, dass geeignete Früherkennungsmaßnahmen zu einer deutlichen Senkung der Sterblichkeit beitragen können. Die Krebsbehandlung (Operation, Bestrahlung, Chemotherapie) hat generell die besten Erfolgsaussichten, falls der Krebs in einem frühen Stadium erkannt wird. So können die kranken Bereiche oft durch eine Operation und Bestrahlung ohne zusätzliche Chemotherapie behandelt werden. Je später die Diagnose Krebs gestellt wird, desto stärker kann das Gewebe oder lebenswichtige Organ bereits durch Wucherung befallen und in seiner Funktion eingeschränkt sein und somit ein inoperabler Befund vorliegen. Des Weiteren besteht die Gefahr, dass durch Befall der Lymphknoten ein Streuen der Krebsherde in weitere Körperregionen und somit die Bildung von Metastasen erfolgt. Wie aus der Krebsstatistik ersichtlich ist, sind bei ca. 57% der zum Tode führenden Krebsdiagnosen bei Männern und bei ca. 47% bei Frauen Organe betroffen, die endoskopisch erreichbar sind. Routinemäßig werden bereits Magen-Darmspiegelungen (Gastro-/Koloskopien) durchgeführt, aber auch Spiegelungen der Lunge (Bronchoskopie) sowie der Speiseröhre und Harnblase finden im klinischen Alltag Anwendung. Die fluoreszenzendoskopische Tumordiagnostik besitzt somit ein hohes Potenzial für die Krebsfrüherkennung.

#### **1.4.2 Historische Entwicklung der Photodynamischen Therapie**

Bereits im Altertum fand das Konzept der Photodynamischen Therapie (PDT) Anwendung. So wurde 1000 v. Chr. in Ägypten die Weißfleckenkrankheit (Vitiligo) mit Pflanzensäften und Sonnenlicht behandelt und im alten China versuchte man, Hautkrebs mit porphyrinhaltigem Kot von Seidenraupen zu heilen. Erst Anfang des 20. Jahrhunderts wurde diese Therapieform wiederentdeckt. So berichtete Raab im Jahre 1900, dass die Einwirkung von diffusem Tageslicht auf mit Acridinorange inkubierte Wimpertierchen zu deren Tod führte<sup>[11]</sup>. 1903 entwickelten Tappeiner und Jesionek das Grundprinzip der Photodynamischen Therapie, wobei sie Eosin und Sonnenlicht zur Behandlung von Hautkrebs einsetzten<sup>[12]</sup>. Zehn Jahre später entdeckte Meyer-Betz die Eignung von Porphyrinverbindungen zur PDT<sup>[13]</sup>. Dieses Erkenntnis wurde 1942 von Auler und Banzer bestätigt, die nach intravenöser Injektion eine selektive Anrei-

cherung der Porphyrine in malignem Gewebe feststellten<sup>[14]</sup>. Auch Figge erkannte die Möglichkeit der Krebsdiagnostik und Therapie durch Porphyrine und Metalloporphyrine<sup>[15]</sup>. 1961 gelang Lipson schließlich die Synthese des Hämatoporphyrinderivats (HpD) durch Versetzen von Hämatoporphyrin mit einer Mischung von Eisessig und Schwefelsäure<sup>[16]</sup>. Dieser Photosensibilisator eröffnete nach erfolgreicher Behandlung einer Brustkrebspatientin den Weg in die klinische Praxis und kann als Vorläufer der heute noch verwendeten Photofrin-II und Photosan-3 angesehen werden<sup>[17]</sup>. Zur Bestrahlung verwendete man zunächst Sonnenlicht, später dann Bogenlampen. Die Einführung der Lasertechnik brachte die Möglichkeit, über Lichtleiter präzise mit hoher Leuchtdichte zu bestrahlen<sup>[18]</sup> und durch die Technik der Endoskopie ergab sich eine Vielzahl neuer Anwendungsbereiche. Prinzipiell konnte nun jedes endoskopisch erreichbare Organ, wie z.B. Harnblase, Lunge und der gesamte Gastrointestinaltrakt, der PDT unterzogen werden.

### 1.4.3 Photosensibilisatoren

Die als Photosensibilisator verwendeten Verbindungen müssen gewisse Voraussetzungen erfüllen. Neben einer hohen Phototoxizität, die durch die photochemischen Eigenschaften sowie intrazelluläre Konzentration und Lokalisation festgelegt wird, sollte ein idealer Photosensibilisator keine oder nur minimale Dunkeltoxizität aufweisen<sup>[19]</sup>. Entscheidende photochemische Merkmale sind neben einer hohen Quantenausbeute und einer langen Lebensdauer des angeregten Triplettzustands, eine Absorption im möglichst langwelligen sichtbaren Bereich ( $\lambda > 600 \text{ nm}$ ) bei großem molaren Absorptionskoeffizienten ( $\epsilon > 50\,000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), was ein tiefes Eindringen der Strahlung ins Gewebe begünstigt<sup>[20, 21]</sup>. Bei der Tumordiagnostik werden noch höhere Anforderungen an den Photosensibilisator gestellt. So können nur Verbindungen mit keinerlei Dunkeltoxizität Anwendung im klinischen Alltag der PDD finden. Des Weiteren müssen sich die Verbindungen hochselektiv in krankhaft verändertem Gewebe anreichern und diese durch ausreichende Fluoreszenz vom umgebenden gesunden Gewebe abheben. Der Mechanismus der dabei ablaufenden Vorgänge kann wie folgt beschrieben werden:

Der Photosensibilisator (PS) wird durch Absorption von Photonen aus seinem Grundzustand  $S_0$  in den angeregten Singulettzustand  $S_1$  angehoben (Abb. 2).

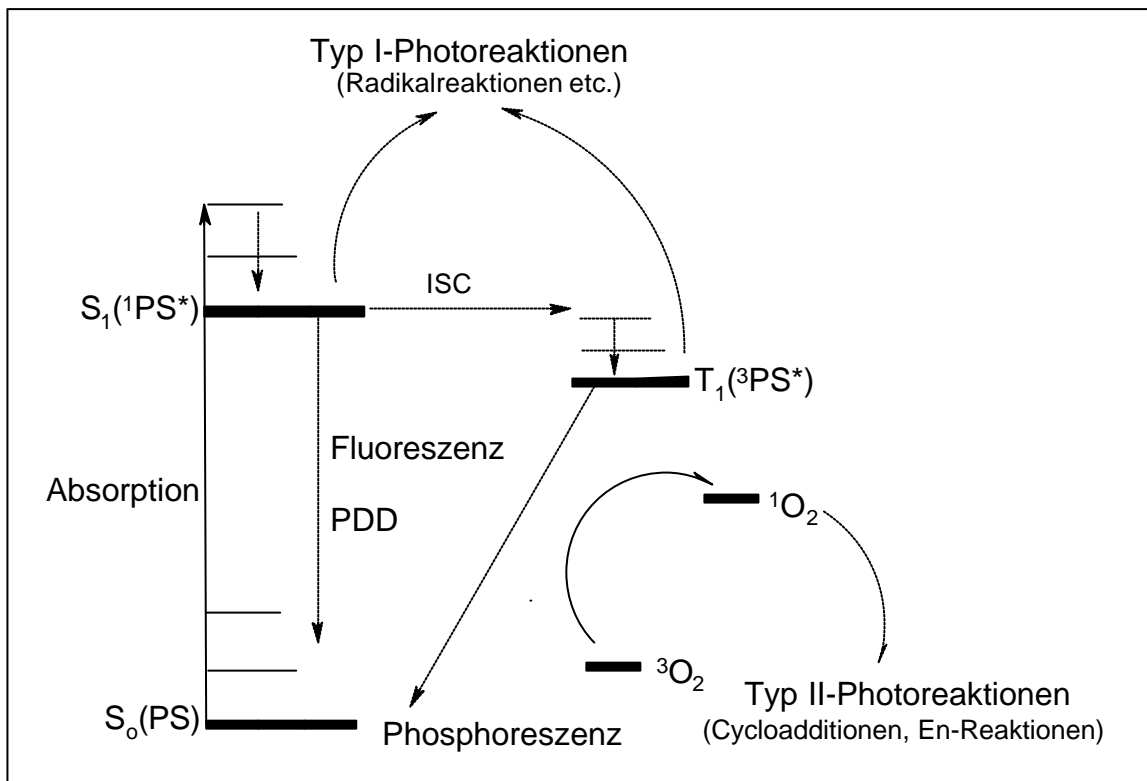


Abbildung 2: Energetische Prozesse bei der PDD und PDT

Die dabei aufgenommene Energie wird auf unterschiedlichen Wegen wieder abgegeben. So kommt es beim Übergang in den Ausgangszustand  $S_0$  zur Energieabgabe in Form von Fluoreszenzstrahlung, einem Vorgang, der bei der PDD ausgenutzt wird. Zudem kann die aufgenommene Energie auch dazu verwendet werden, Photoreaktionen des Typs I auszulösen. Hierbei handelt es sich um Radikalreaktionen oder Redoxprozesse, wobei der angeregte Photosensibilisator zur Oxidation funktioneller Gruppen von Biomolekülen (Amine, Thiole etc.) oder zur Reduktion von Sauerstoff unter Bildung von Superoxid in der Lage ist.

Andererseits kann auch durch Intersystem Crossing (ISC) ein Übergang in den angeregten Triplettzustand  $T_1$  erfolgen. Von dort kann die gespeicherte Energie direkt in Form phosphoreszenter Strahlung abgegeben werden. Wahrscheinlicher als dieser spinverbotene Übergang ist jedoch die Stabilisierung durch einen Triplett-Triplett-Energietransfer zwischen dem angeregten Photosensibilisator und intrazellulärem  $O_2$ . Dabei kommt es zur Bildung von Singulett-Sauerstoff  $^1O_2$ , einer hochreaktiven, kurzle-



bigen Spezies, die leicht Typ II-Photoreaktionen wie [2+2]- und [4+2]-Cycloadditionen sowie En-Reaktionen mit funktionellen Gruppen von Biomolekülen (ungesättigten Lipiden, Aminosäuren, etc.) eingeht<sup>[22]</sup>. Die dadurch verursachte zell- und gefäßschädigende Wirkung wird bei der PDT ausgenützt. Entscheidend für die Schädigung ist natürlich die Lokalisation des Photosensibilisators in der Zelle, da der kurzlebige Singulett-Sauerstoff nur ca. 0,01  $\mu\text{m}$  diffundieren kann und somit seine zerstörerische Wirkung hauptsächlich am Ort seiner Entstehung entfaltet. Primärziele sind neben Aminosäuren (Histidin, Methionin, Tryptophan, Tyrosin und Cystein) Lipide ( $\rightarrow$  Membranschäden) sowie Nukleinsäuren ( $\rightarrow$  Mutation und Brüche der DNA)<sup>[23, 24]</sup>. Die Effektivität einer photodynamischen Behandlung hängt neben den Photosensibilisator- und den Gewebeeigenschaften in großem Maße von der Wellenlänge und der Energiedichte der applizierten Strahlung ab. Je näher die Anregungswellenlänge am Absorptionsmaximum des Photosensibilisators liegt, desto größer ist in der Regel die aufgenommene Energie. Typische Energiedichten in der PDT liegen zwischen 10 und 500  $\text{J}/\text{cm}^2$ . Die Absorption ist zudem in großem Maße abhängig von der zu bestrahlenden Gewebeart und differiert zwischen einzelnen Organen sehr stark ( $\mu_{\text{Prostata}, 633 \text{ nm}} = 0.45 \text{ mm}^{-1}$ ,  $\mu_{\text{Leber}, 633 \text{ nm}} = 1.96 \text{ mm}^{-1}$ ). Bei der Auswahl eines idealen Wellenlängenbereichs spielen die Absorption des Gewebes und die nötige von der Tumorart abhängige Eindringtiefe eine entscheidende Rolle. Diese steigt bis zu einer Wellenlänge von 680 nm stark an und erreicht über 800 nm ein Plateau. Der für die PDT sinnvolle Wellenlängenbereich wird durch die Absorption von Hämoglobin und von Wasser auf das so genannte therapeutische Fenster von ca. 600-850 nm begrenzt. Die optische Penetrationstiefe des Lichts ins Gewebe ist abhängig von der eingestrahlten Wellenlänge und vom Gewebe- bzw. Tumortyp. So liegt die Penetrationstiefe unterhalb von 400 nm bei weniger als 1 mm, wohingegen Wellenlängen von 700–800 nm eine Eindringtiefe von 5-10 mm ermöglichen. Bei oberflächlichen Tumoren, wie z.B. einem Carcinoma in situ der Harnblase, ist nur eine Eindringtiefe von 1-2 mm notwendig, sodass mit entsprechend effektiver kurzwelliger Strahlung behandelt werden kann.

#### 1.4.4 Klinische Anwendung der PDT und PDD

Theoretisch sind alle oberflächlichen sowie endoskopisch bestrahlbaren Körperregionen für die PDT und die PDD zugänglich. Die Applikation mit der Photosensibilisatorlösung (1-5 mg pro kg Körpergewicht) erfolgt je nach Problemstellung entweder topisch oder systemisch. Nach Ablauf der idealen Inkubationszeit und optimaler Akkumulation im Tumorgewebe kann nun je nach Aufgabenstellung entweder zur PDD die Bestrahlung mit violetter (kurzwelliger Absorptionsbereich des Photosensibilisators) Licht geringer Intensität oder zur PDT die Bestrahlung mit Rotlicht und höherer Intensität erfolgen. Hierbei findet die Lasertechnik (Gas-, Festkörper-, Feststofflaser) und die Endoskopie Anwendung. Die bei der PDT erwünschten Folgereaktionen setzen schon wenige Stunden nach der Bestrahlung ein. Es kommt zum Absterben der Tumorzellen durch Apoptose (programmierter Zelltod) bzw. durch Nekrose (Gewebsverletzungen, Gifteinwirkung, Nährstoffmangel)<sup>[25]</sup>, was bereits nach wenigen Wochen bei ca. 80% der Fälle zu einer vollständigen Tumorregression führt. Neben Haut- und Blasenkrebs findet die PDT auch bei Bronchial-, Speiseröhren-, Hirn- und Augentumoren Anwendung. Aktuelle Forschungsarbeiten beschäftigen sich mit der Therapie und Diagnostik von Tumoren des Gastrointestinaltrakts<sup>[26]</sup>.

### 1.5 5-Aminolävulinsäure (ALA) in der PDT und PDD

#### 1.5.1 PPIX-Biosynthese

Prinzipiell besitzt jede Zelle die Fähigkeit durch enzymatische Kondensation (ALA-Synthetase) aus Glycin und Succinyl-CoA ALA zu produzieren (Abb. 3a und 3b). Im Weiteren katalysiert das im Zytosol lokalisierte Enzym ALA-Dehydrogenase (ALA-D) die Kondensation zweier ALA-Moleküle zum Porphobilinogen (PBG). Aus vier solcher PBG-Einheiten wird in mehreren enzymatischen Folgeschritten das mitochondrial lokalisierte Protoporphyrin IX (PPIX) gebildet. ALA ist im Gegensatz zu den bei der PDT häufig verwendeten Hämatoporphyrinderivaten Photofrin und Photosan selbst kein Photosensibilisator, sondern eine Vorstufe von Protoporphyrin IX

(PPIX), aus dem durch enzymkatalysierte Eiseneinlagerung (Ferrochelatase) schließlich Häm gebildet wird. In gesunden Zellen ist die ALA-Synthese strikt durch Feedback-Kontrolle gesteuert, die von der intrazellulären Häm-Konzentration abhängt. So wird bei zu hoher Häm-Konzentration die ALA-Synthetase gehemmt. Dieser Kontrollmechanismus wird durch exogene ALA-Gabe umgangen, wodurch es in Tumorzellen zu einer PPIX-Akkumulation kommt.

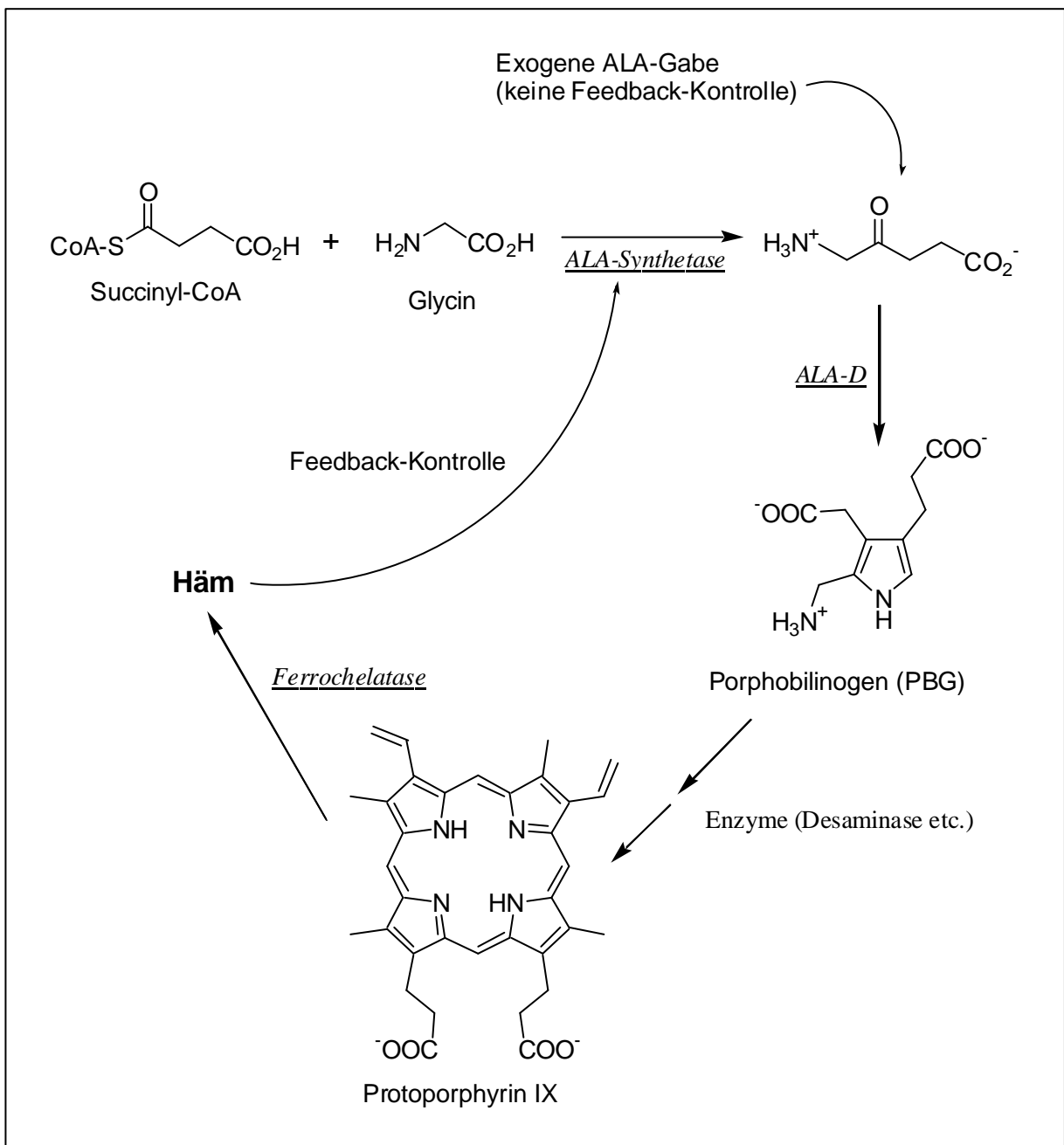


Abbildung 3a: Feedback-Kontrollmechanismus der PPIX-Biosynthese

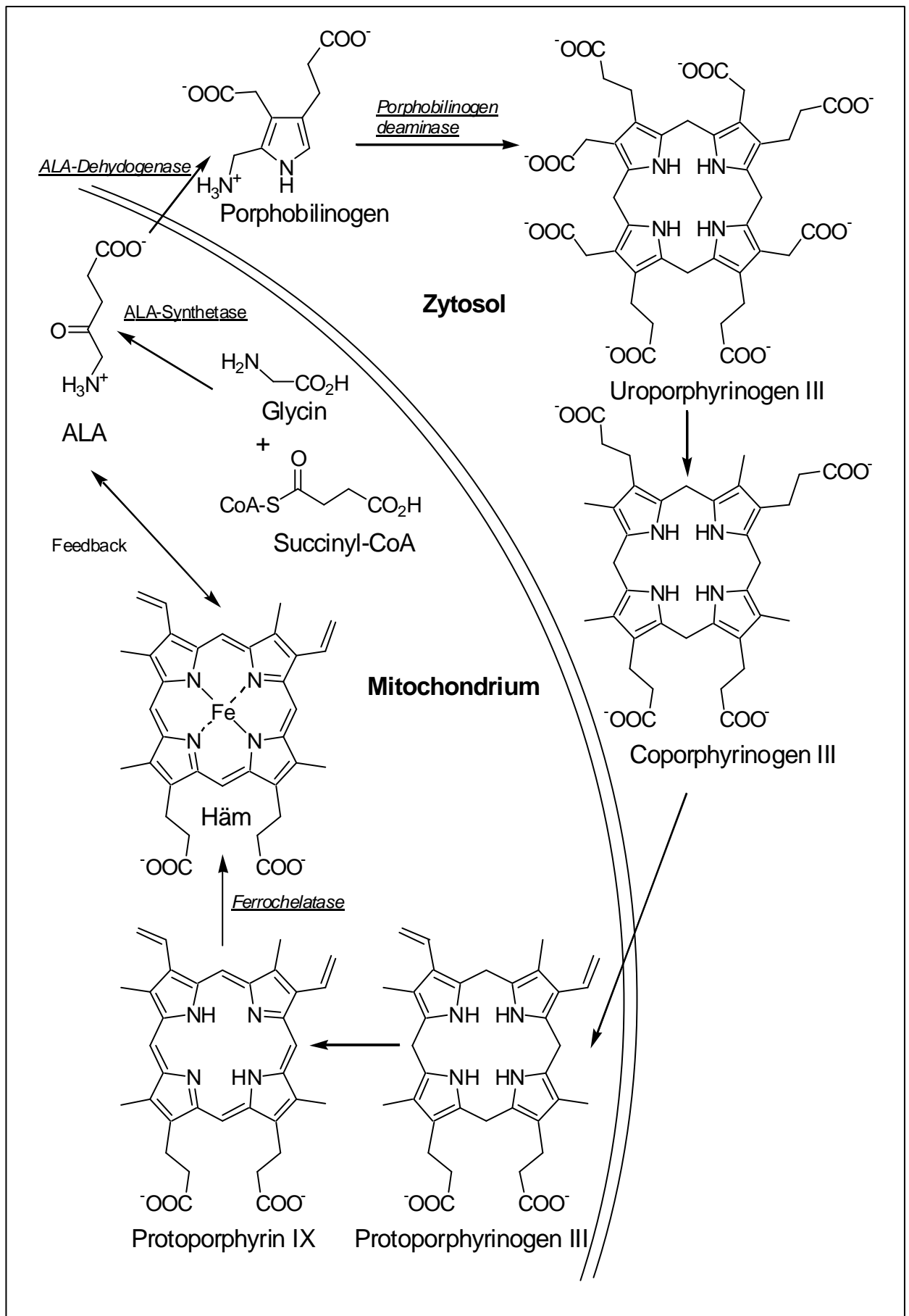


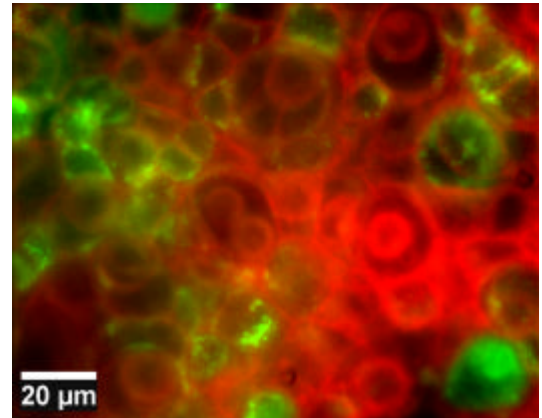
Abbildung 3b: PPIX-Biosynthese

Die genauen Ursachen für die tumorselektive PPIX-Akkumulation sind bisher noch unklar, sind jedoch Gegenstand aktueller Forschungen. Möglicherweise sind Unterschiede im Metabolismus und den Membraneigenschaften zwischen normalen und entarteten Zellen dafür verantwortlich (unterschiedliche ALA-Aufnahme, PPIX-Bildung und PPIX-Ausschleusung). Des Weiteren werden eine verminderte Ferrochelatase-Aktivität oder ein Eisendefizit der Tumorzellen sowie eine erhöhte Porphobilinogendeaminase-Aktivität als Ursache in Betracht gezogen. Eine weitere Erhöhung der PPIX-Konzentration kann durch Zufuhr von Eisen-Komplexbildnern oder von Thiolen (Thiolaktivierung der ALA-D) erreicht werden. PPIX stellt einen idealen Photosensibilisator dar, der nach Anregung mit Licht entsprechender Wellenlänge einerseits zur Photodynamischen Tumordiagnostik (PDD) und andererseits zur Photodynamischen Tumorthherapie (PDT) herangezogen werden kann. Bei der PDD nutzt man die selektive Anreicherung von PPIX in entartetem Gewebe. Unter Blaulichtbestrahlung können mittels der charakteristischen Rotfluoreszenz von PPIX Präkanzerosen und Frühkarzinome lokalisiert und von gesundem Gewebe abgegrenzt werden. Damit kommt der Fluoreszenzendoskopie mit ALA große Bedeutung bei der Krebsfrüherkennung zu. Bei der PDT wird nach ALA-Applikation und tumorselektiver PPIX-Akkumulation mit Rotlicht bestrahlt. Die Anregung von PPIX erfolgt bei der ALA-PDD mit einer Wellenlänge von 405 nm (blauer Lichtbereich) im Absorptionsmaximum, wohingegen bei der ALA-PDT mit einer Wellenlänge von 630 nm (roter Lichtbereich) im langwelligsten Absorptionsmaximum angeregt wird, um eine möglichst hohe Eindringtiefe ins Gewebe zu erreichen.

### 1.5.2 Klinische Anwendung

1987 führten Kennedy und Pottier<sup>[27]</sup> nach ersten Vorarbeiten von Malik und Lugaci<sup>[28]</sup> (ALA-induzierte PPIX-Akkumulation in Leukämiezellen und soliden Tumoren) sowie Peng et al.<sup>[29]</sup> (erste Untersuchungen am Tiermodell) eine neue faszinierende Methode der photodynamischen Therapie in die klinische Anwendung ein, bei der 5-Aminolävulinsäure eingesetzt wird. Das im Zuge der Häm-Biosynthese gebildete PPIX besitzt exzellente Fluoreszenzeigenschaften und kann als optimaler Photosensibilisator angesehen werden. Im Vergleich zum heute bei der PDT standardmäßig systemisch applizierten Photofrin besitzt ALA einige entscheidende Vorteile. Photofrin reichert sich nur wenig selektiv in Tumoren an, kann nicht topisch appliziert werden und führt zu einer generalisierten Sensibilisierung der Patienten gegenüber Sonnenlicht für mehrere Wochen. ALA-induziertes PPIX weist neben einer sehr hohen Tumorselektivität keinerlei Dunkeltoxizität auf. Aufgrund rascher Eliminierung aus dem Körper kommt es zu einer sehr geringen Photosensibilisierung. So verweilt PPIX im Gegensatz zu Photofrin (mehrere Wochen) nur ca. 24 Stunden im Körper, sodass Schädigungen des gesunden Gewebes durch die Einwirkung von Tageslicht minimiert werden. Zudem zeigt ALA im Gegensatz zu der unzureichenden und sehr langsamen Aufnahme der Makromoleküle Photosan und Photofrin bereits nach ein bis sechs Stunden eine Anreicherung des Photosensibilisators, die bei intravenöser Gabe von Photofrin erst nach 96 Stunden erzielt wird. Sowohl bei intravenöser als auch bei oraler Applikation reichert sich ALA vermehrt in krankhaft verändertem Gewebe an. Somit stellt die ALA-PDT eine sehr schonende und effektive Methode zur Tumorthherapie dar. Bei einer Reihe verschiedener nichtkanzerogener Hautkrankheiten wie Schuppenflechte, Akne und Warzen werden ALA oder ALA-Derivate in Form von Salben eingesetzt<sup>[30,31]</sup>. Aber auch bei der Behandlung von Hautkrebs sowie der Therapie vieler weiterer Krebserkrankungen konnten mit ALA große Erfolge erzielt werden<sup>[32]</sup>. Eine weitere wichtige Anwendung findet ALA in der Tumordiagnostik, der eine herausragende Stellung bei der Krebsbekämpfung zukommt. Können Krebserkrankungen der Haut, Lunge oder Blase zum Beispiel schon im frühen Stadium erkannt werden, vervielfachen sich die Chancen auf eine erfolgreiche Behandlung<sup>[33]</sup>. Auch die früher

sehr schwierige bzw. oftmals sogar unmögliche Diagnostik von Präkanzerosen und Frühkarzinomen im Gastrointestinaltrakt (Speiseröhre, Magen, Darm) ist durch ALA-Applikation möglich. Nach oraler Gabe der ALA-Lösung und ca. vierstündiger Inkubationszeit kann nach Anregung mit Blaulicht mittels Fluoreszenzendoskopie die ALA-induzierte PPIX-Akkumulation anhand der charakteristischen Rotfluoreszenz detektiert werden. So können schon leichte Dysplasien erkannt werden. Des Weiteren können auch während bzw. nach Operationen die Vollständigkeit der Tumorresektion mittels ALA-PDD kontrolliert und restliche Tumorzellen detektiert werden. Die Abbildung zur Rechten zeigt eine fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der PPIX-Fluoreszenz in einer Adenokarzinom-Zelllinie.



### 1.5.2 Marktpotenzial

1991 erhielten Kennedy und Pottier ein Patent<sup>[34]</sup> für ihre Arbeiten über die Photodynamische Tumorthherapie und -diagnostik mit 5-Aminolävulinsäure und noch im selben Jahr wurde ein Lizenzvertrag mit der DUSA Pharmaceuticals Inc.<sup>[35]</sup> aus Toronto abgeschlossen. Im September 2000 bekam DUSA in den USA die Zulassung für ihr Levulan® Photodynamic Therapy System zur Behandlung von Acinic Ceratosis (AC: sonneninduzierte präkanzeröse Hautläsionen) des Gesichts und der Kopfhaut. In den USA werden schätzungsweise bis zu 4 Millionen Patienten mit Acinic Ceratosis jährlich behandelt. Zudem sind klinische Studien der Phase II für die Verwendung von ALA zur PDD der Harnblase (schätzungsweise bis zu 900 000 Blasenspiegelungen jährlich in den USA) sowie zur Aknebehandlung bereits abgeschlossen. DUSA Pharmaceuticals Inc. kooperiert mit der Schering AG im Bereich Photodynamische Therapie von Hauterkrankungen. Seit April 1997 hält die Schering AG 25% der Anteile der medac GmbH. Seit dieser Zeit arbeiten beide Firmen erfolgreich vornehmlich auf dem Gebiet der Onkologie zusammen. 1998 lizenzierte Schering die Aminolävulinsäure

für die Diagnose des oberflächlichen Harnblasenkarzinoms für die meisten europäischen Länder.

Aufgrund der geringen Lipophilie von ALA ist die Aufnahme durch die Zellmembran und die damit verbundene intrazelluläre PPIX-Akkumulation limitiert. Eine Möglichkeit, die Lipophilie von ALA zu steigern, stellt die Synthese von ALA-Estern dar. Als besonders interessant haben sich hierbei für die PDT und die PDD der Haut der ALA-Methylester, für die PDD im Gastrointestinaltrakt der ALA-Benzylester und der ALA-Hexylester und für die PDT und PDD in der Harnblase der ALA-Hexylester erwiesen. Diese Verbindungen sind durch Patente<sup>[36]</sup> geschützt und werden vom norwegischen Unternehmen Photocure unter dem Handelsnamen Metvix® (ALA-Methylester, PDT/PDD der Haut, Acinic Ceratosis, Basal Cell Carcinoma, klinische Studien abgeschlossen), Benzvix® (ALA-Benzylester, PDD des Gastrointestinaltrakts, präklinische Studien) und Hexvix® (ALA-Hexylester, PDT/PDD der Harnblase, klinische Studien Phase III) getestet, um sie anschließend zu vermarkten. Metvix® ist bereits in elf europäischen Ländern zugelassen, die Zulassung in den USA und Australien ist beantragt. Die klinischen Studien der Phase III mit Hexvix® für die PDD der Harnblase in Europa sowie den USA sind angelaufen. Damit hat der Kampf um Marktanteile in den USA und Europa zwischen DUSA und Photocure speziell auf dem Gebiet der PDT der Haut und der PDD der Blase begonnen. Marktstudien prognostizieren ein hohes Wachstum des PDT-Markts und geben bis zu einer Milliarde Euro an, davon ca. 700 Millionen Euro für den Bereich der PDT-Medikamente.

## 1.6 Karzinome des Gastrointestinaltrakts<sup>[37]</sup>

Der Gastrointestinaltrakt (GIT) lässt sich in Speiseröhre, Magen und Darm unterteilen, welche aus mehreren aufeinanderfolgenden Gewebsschichten aufgebaut sind. Man unterscheidet dabei die Tunica Mucosa (Schleimhaut: Sekretion und Resorption), Tunica submucosa (Bindegewebe: Stützfunktion), Tunica muscularis (Muskelschicht: Peristaltik) und Tunica adventitia (Bindegewebe: Umhüllung). Bei ca. 20% der zum Tode führenden Krebserkrankungen handelt es sich um Karzinome des Gastrointesti-



naltrakts. Von der Vielzahl möglicher Erkrankungen des GIT kommt dem Barrett-Ösophagus und der Colitis Ulcerosa besondere klinische Bedeutung zu, da beide mit einem deutlich erhöhten Karzinomrisiko einhergehen.

### **1.6.1 Ösophaguskarzinom**

Das Ösophaguskarzinom (Krebs der Speiseröhre) macht etwa 1% aller Krebserkrankungen aus und tritt bei Männern zwei- bis fünfmal häufiger auf als bei Frauen. Ursachen sind neben übermäßigem Alkohol- und Nikotinkonsum, Vitaminmangel sowie durch sauren Reflux ausgelöstes Sodbrennen. Auch medizinisch prädisponierende Faktoren wie z.B. Verätzungen oder Barrett-Ösophagus spielen eine wichtige Rolle. Barrett-Ösophagus entsteht durch chronischen sauren Reflux im unteren Bereich des Ösophagus. Die dadurch verursachte permanente Reizung und das dauerhafte unphysiologische Milieu können zu zellulären Veränderungen der Epithelschicht (Plattenepithel → Darmentithel) und zur Bildung von niedrig bis hochgradigen Dysplasien führen. Das Auftreten von solchen Dysplasien bedingt wiederum ein um den Faktor 30-125fach erhöhtes Risiko, an einem Ösophaguskarzinom zu erkranken. Die Heilungschancen des Ösophaguskarzinoms sind derzeit mit unter 10% noch sehr gering. Grund hierfür ist die späte Diagnose, die oft erst bei weit fortgeschrittener Lumeneinengung und tiefer Tumordinvasion gestellt wird. Die Endoskopie ist hierbei die wirksamste diagnostische Maßnahme. Bei Patienten mit Barrett-Ösophagus ist je nach Dysplasiegrad alle 1 bis 2 Jahre eine endoskopische Untersuchung nötig.

### **1.6.2 Magenkarzinom**

Das Magenkarzinom, das in Mitteleuropa ca. 8% aller Krebserkrankungen ausmacht, weist eine sehr niedrige Überlebensrate von nur ca. 20% auf. Grund hierfür sind einerseits die unspezifischen Symptome (Übelkeit, Erbrechen, Gewichtsverlust, etc.), die erst bei fortgeschrittenem Erkrankungsstadium auftreten und andererseits die Neigung zur Fernmetastasenbildung vor allem in Leber und Lunge, aber auch in Knochen und

dem zentralen Nervensystem. Daraus wird deutlich, wie wichtig bei einer solch aggressiven Krebsform eine gezielte frühzeitige Diagnostik mittels endoskopischer Methoden ist.

### 1.6.3 Kolonkarzinom

Die Ursachen für Darmkrebs sind noch nicht völlig geklärt. Eine wichtige Rolle spielt die erbliche Veranlagung. So ist das Erkrankungsrisiko bei Verwandten ersten Grades von Darmkrebspatienten um das Zwei- bis Vierfache erhöht. Besondere Risikofaktoren sind weiterhin fettreiche, balaststoff- und vitaminarme Ernährung, Alkohol und Zigarettenkonsum sowie Übergewicht. Weitere Ursachen sind entzündliche Erkrankungen der Darmschleimhaut wie Morbus Crohn und Colitis ulcerosa. Die Colitis ulcerosa stellt eine Entzündung der Kolonschleimhaut dar, die zu einem totalen Funktionsausfall führt und als Präkanzerose klassifiziert werden kann. Die entstehenden Schleimhautdysplasien korrelieren mit einem deutlich erhöhten Karzinomrisiko. Da das Kolonkarzinom beim Menschen die zweithäufigste Krebstodesursache ist und jährlich in Deutschland ca. 23 000 Männer und 29 000 Frauen an Dick- und Mastdarmkrebs erkranken, gleichzeitig dieser aber relativ unempfindlich für Zytostatika (Standardtherapie 5-Fluoruracil/Folinsäure) ist, obliegt der Früherkennung eine herausragende Bedeutung. Bei Verdacht auf Anomalien werden durch ein Koloskop (Schlauch mit eingebauter Glasfaseroptik) Gewebeproben (Biopsien) entnommen. Anschließend untersucht man diese Biopsien pathologisch. Hierzu werden entsprechende Schnitte des Gewebes (Gefrier-, Paraffinschnitte etc.) angefertigt und diese unter einem Mikroskop auf Krebszellen untersucht. Solche histologischen Untersuchungen sind die einzigen, bei denen Krebs sicher festgestellt oder ausgeschlossen werden kann. Es kann nicht nur die Frage „Krebs oder kein Krebs“ beantwortet, sondern auch festgestellt werden, welche Art von Krebs vorliegt. So treten im Darm auch Krebsarten auf, die nicht von der Darmschleimhaut ausgehen und die spezielle Behandlungsmethoden und Medikation erfordern.

## 1.7 Urothelkarzinom<sup>[37]</sup>

Weltweit steht das Harnblasenkarzinom an sechster Stelle aller malignen Tumorerkrankungen. In der Bundesrepublik Deutschland sterben jährlich ca. 5000 und in den USA etwa 10000 Menschen an Tumorerkrankungen der Harnblase. Männer sind hierbei doppelt so häufig betroffen wie Frauen, wobei der Blasenkrebs nach dem Bronchialkrebs der zweithäufigste Raucherkrebs ist. Die Harnblase setzt sich aus drei verschiedenen Gewebsschichten zusammen. Man unterscheidet die Tunica mucosa (Übergangsepithel und Lamina propria: stark gefaltete Schleimhaut), Tunica muscularis (Muskelschicht aus innerer Längs- und äußerer Ringmuskulatur) und die Tunica adventitia (Gefäßschicht). Über 90% aller Blasenkrebserkrankungen gehen von der inneren Schleimhaut, dem so genannten Urothel der Blase aus. Typisches Leitsymptom ist die schmerzlose Makrohämaturie (blutiger Urin). Die Diagnostik erfolgt mittels einer Blasenspiegelung. Flache Läsionen, die mit bloßem Auge nur schwer zu erkennen sind, können nach vorheriger ALA-Instillation mittels Fluoreszenzendoskopie diagnostiziert werden. Etwa 75% aller Blasentumore sind zum Zeitpunkt der Diagnosestellung oberflächliche Tumore. Diese zeigen eine hohe Rezidivneigung. In 70% der Fälle treten nach der Operation erneut Tumore auf, weshalb nach einer transurethralen Resektion (endoskopisches Abhobeln des Tumors mittels Elektroschlinge) im Rahmen einer adjuvanten Therapie Zytostatika über einen Katheter in die Blase eingespült werden. Eine weitere potenzielle Behandlungsmethode stellt die ALA-PDT dar, bei der nach ALA-Instillation die Blaseninnenwand endoskopisch bestrahlt wird. Der ALA-PDD kommt bei der Vor- und Nachsorgeuntersuchung auf Blasenkrebs eine entscheidende Rolle zu. In den USA werden schätzungsweise bis zu 800000 Blasenspiegelungen jährlich durchgeführt.

## 1.8 Klinische Studien: vom Zelltest zur Zulassung<sup>[38]</sup>

Ziel klinischer Studien ist es, die zuvor in Zelltests und Tierversuchen ermittelten pharmakologischen Wirkungen einer Substanz schrittweise auch am Menschen nach-

zuweisen. Die Phase I der klinischen Studien umfasst alle Untersuchungen an gesunden Probanden, da es unzumutbar wäre, den schon beeinträchtigten Organismus eines Patienten mit den möglichen Nebenwirkungen eines neuen Arzneimittels zu belasten. Hierbei werden nicht die Wirksamkeit der Substanz, sondern die Dosisfindung, die Verträglichkeit (Pharmakodynamik) und die Aufnahme, die Verteilung, der Metabolismus und die Ausscheidung (Pharmakokinetik) des Wirkstoffs untersucht. In der Phase II der klinischen Studien beginnt die Erprobung der Substanz am Patienten. Zunächst wird in einer so genannten offenen Studie die Wirkung der Substanz an wenigen stationären Patienten getestet (regelmäßige Untersuchung von Blut, Urin und Kreislauf). Anschließend wird in kontrollierten Studien eine Patientengruppe mit dem neuen Medikament behandelt und mit einer Vergleichsgruppe, die entweder mit einem bereits zugelassenen Medikament als Standard bzw. mit einem Placebo behandelt wird, verglichen. Ziel der Phase II Studien ist die Erkenntnis, bei welchen Symptomen, bei welchen Patienten und in welcher Dosierung das neue Medikament wirksam und verträglich ist. Die Phase III der klinischen Studien dient dem Nachweis der therapeutischen Wirksamkeit und der Unbedenklichkeit des neuen Medikaments an einer größeren Patientengruppe (einige Hundert bis einige Tausend) gegenüber einem bereits zugelassenen Medikament als Standard bzw. gegenüber einem Placebo. Falls die Wirksamkeit und die Sicherheit des Medikaments in allen Studien bestätigt werden und zuständige nationale Behörden das Nutzen-Risikoverhältnis des neuen Medikaments positiv bewertet haben, kann eine Zulassung des Produkts erfolgen.

## 2 Grundgedanken und Zielvorstellung

Die photodynamische Therapie und Diagnostik mit 5-Aminolävulinsäure stellt einen neuen vielversprechenden Ansatz zur Tumorfrüherkennung und Tumorthherapie dar. So haben sich im letzten Jahrzehnt die PDT und die PDD mit ALA zum dynamischsten Feld dieses Forschungsgebiets entwickelt. Schon lange wird versucht, die geringe Lipophilie der 5-Aminolävulinsäure durch entsprechende Derivatisierung zu erhöhen und damit die Membranpermeabilität zu steigern. Besonderes Augenmerk wurde auf ALA-Ester gelegt und Fluoreszenzmessungen haben gezeigt, dass bestimmte Ester eine deutliche Erhöhung der PPIX-Akkumulation erzielen.

Bei der ALA-esterinduzierten PPIX-Bildung sind zwei wichtige Schritte zu unterscheiden, einerseits der Transport durch die Zellmembran und andererseits die anschließende Esterspaltung durch unspezifische Esterasen. Als besonders effektiv haben sich in zahlreichen *in vivo*- und *in vitro*-Untersuchungen der ALA-Hexylester und der ALA-Benzylester herausgestellt. Ausgehend von diesen Leitstrukturen sollen neue ALA-Ester synthetisiert und durch Charakterisierung ihrer zellbiologischen Eigenschaften geeignete Verbindungen für die photodynamische Therapie und Diagnostik gefunden werden.

Die Verbindungen müssen dabei bestimmte Grundvoraussetzungen erfüllen, um für eine klinische Anwendung in Frage zu kommen:

Neben einer guten Wasserlöslichkeit (→ Applikation) müssen die Verbindungen eine ausreichende Stabilität in wässrigen Lösungen aufweisen. Weiterhin dürfen sie keinerlei Dunkeltoxizität zeigen, um für eine routinemäßige klinische Anwendung in Frage zu kommen. Ferner ist eine hohe PPIX-Akkumulation im kranken, bei gleichzeitig zu vernachlässigend kleiner Anreicherung im gesunden Gewebe von entscheidender Bedeutung. Zudem wäre eine hohe PPIX-Anreicherung nach kurzen Inkubationszeiten wünschenswert, um patientenfreundliche kürzere Behandlungszeiten zu ermöglichen. Ausdrückliches Ziel war es, die Untersuchungen praxisbezogen im Hinblick auf die klinische Anwendung und Durchführbarkeit zu gestalten.

Für die zellbiologischen Untersuchungen wurden zwei verschiedene *in vitro*-Modelle ausgewählt. Als Modell für die Harnblase dienten die Urothelkarzinom-Zelllinie J82

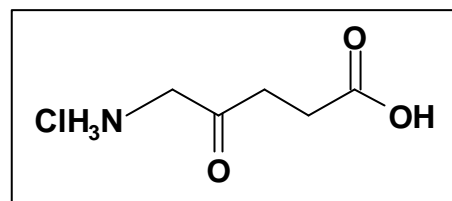
sowie als Vertreter des normalen Gewebes die Urothel-Zelllinie UROTSA. Das Kolonmodell wurde durch die Adenokarzinom-Zelllinie HT29 sowie als Vertreter des gesunden Darmbindegewebes durch die Fibroblasten-Zelllinie CCD18 repräsentiert. In einem ersten Screening sollte die PPIX-Akkumulation der Ester durchflusszytometrisch bestimmt werden. Von den effektivsten Verbindungen sollten PPIX-Bildungskinetiken zur Bestimmung optimaler Inkubationszeiten gemessen werden. Neben der Dunkeltoxizität sollte zudem das PPIX-Akkumulationsverhältnis zwischen Karzinomzellen und normalen Zellen bestimmt und entsprechende Akkumulationsindices sollten berechnet werden. Abschließend sollte in Phototoxizitätstests die Eignung der Substanzen für die PDT getestet werden.

Ziel dieser Arbeit war es, Synthesewege für die systematische Synthese von ALA-Estern zu entwickeln und durch Variation der Hexylester- und Benzylester-Grundstrukturen neue ALA-Derivate zu gewinnen. Hierdurch sollten eine höhere und schnellere PPIX-Akkumulation, eine Erhöhung der Phototoxizität und eine Steigerung der Akkumulationsindices im Vergleich zum Hexylester erzielt und somit die diagnostischen und therapeutischen Eigenschaften verbessert werden.

## 3 5-Aminolävulinsäurederivate in PDT und PDD

### 3.1 Derivatisierungsstrategien

Die exogene Gabe von 5-Aminolävulinsäure findet weltweit in PDT und PDD immer größeren Anklang. Dennoch besitzt ALA auch negative Eigenschaften. Aufgrund mangelnder Lipophilie



zeigt ALA ein geringes Diffusionsvermögen durch die Zellmembran und eine geringe Penetrationstiefe in Haut und Gewebe<sup>[39]</sup>. Unter physiologischen Bedingungen liegt ALA als Zwitterion vor. Sie wird im Magen-Darmtrakt und durch das Stratum corneum (Hauptbarriere beim Eintritt durch die Haut) nur unzureichend aufgenommen. Folglich müssen hohe ALA-Dosen verabreicht werden, um die für eine PDT nötigen PPIX-Konzentrationen zu erreichen. Weitere negative Faktoren sind neben einer inhomogenen Biodistribution auch kinetische Aspekte<sup>[40]</sup>. So dauert es ca. vier Stunden bis die zu einer Fluoreszenzendoskopie nötige PPIX-Menge gebildet ist. Um die Zeitspanne zwischen oraler Gabe und Untersuchung zu verkürzen, müsste bei Verwendung von ALA eine höhere Konzentration verabreicht werden, was aufgrund schädlicher Nebenwirkungen (in sehr hohen Dosen wurde für ALA sogar Toxizität nachgewiesen) zu vermeiden ist.

Die Synthese von 5-Aminolävulinsäurederivaten stellt einen vielversprechenden Ansatz dar, die therapeutischen Eigenschaften von ALA zu verbessern. Entscheidend ist hierbei neben der Erhöhung der Membranpermeabilität, dass aus dem Derivat (ALA-Prodrug) durch entsprechende Enzyme in der Zelle möglichst rasch ALA freigesetzt und die PPIX-Biosynthese gestartet wird. Die 5-Aminolävulinsäure liegt als käufliches Produkt in Salzform (Hydrochlorid) vor. Sie besitzt drei funktionelle Gruppen (Carbonyl-, Carboxyl- und Aminofunktionalität), die für eine Modifikation in Frage kommen. Diese Multifunktionalität eröffnet viele Möglichkeiten, macht aber gleichzeitig gezielte Synthesen aufgrund möglicher Nebenreaktionen schwierig. Es wurden außer intramolekularen Ringschlüssen (? Lactam) auch Dimerisierungen (? Porphobilinogen) und andere Konkurrenzreaktionen bei Einsatz entsprechender Reagenzien beobachtet.

Neben einer gewünschten Veresterung können nach Aktivierung der Carbonsäure so theoretisch intermolekulare Amidbildung und intramolekularer Ringschluss (? Sechsringlactam) auftreten. Die exzellente Wasserlöslichkeit des 5-Aminolävulinsäurehydrochlorids, ein großer Vorteil bei der Applikation, ist der entscheidende Nachteil bei der Synthese. ALA-Hydrochlorid löst sich nur sehr schlecht bzw. überhaupt nicht in organischen Solvenzien.

### 3.2 5-Aminolävulinsäureester

1995 wurde von Peng et al.<sup>[41, 42]</sup> erstmals nachgewiesen, dass verschiedene ALA-Ester eine stärkere Fluoreszenz in Hautzellen hervorrufen als die freie Säure. Ein Jahr später bestätigten Klok et al.<sup>[43]</sup> diese These, als sie bei *in vitro*-Extraktionsversuchen feststellten, dass bestimmte Ester eine deutlich höhere PPIX-Akkumulation als ALA induzierten. So konnte die PPIX-Anreicherung im Vergleich zu ALA um das 30-fache gesteigert werden, wobei die größten Unterschiede bei sehr kurzen Inkubationszeiten erzielt wurden. Die Ursachen für die unterschiedliche ALA- bzw. ALA-esterinduzierte PPIX-Akkumulation sind bisher noch nicht eindeutig geklärt. Verschiedene zelluläre Aufnahmemechanismen (ALA: aktiver Transport durch Peptid-Carriersystem, Ester: passive Diffusion) führen zu einer schnelleren Aufnahme der Ester im Vergleich zu ALA. PPIX-Bildungskinetiken nach Kurzzeitinkubation sowie Messungen der Aufnahmegeschwindigkeit durch Radiomarkierung von ALA und ALA-Estern<sup>[44]</sup> zeigen, dass die Ester sehr viel schneller in die Tumorzelle aufgenommen werden als ALA. Der drastische Unterschied in der Aufnahmegeschwindigkeit führt zu einer extremen Steigerung der ALA-esterinduzierten PPIX-Akkumulation auch nach kurzen Inkubationszeiten und bei geringen Konzentrationen. Somit werden die für die PDD und PDT nötigen PPIX-Anreicherungen auch nach kurzen und somit patientenfreundlichen Inkubationszeiten erzielt. Die PPIX-Akkumulation hängt in entscheidendem Maße von der Struktur des zur Veresterung verwendeten Alkohols ab. So sind geradkettige, kurze Kohlenwasserstoffketten (C1-C3) weniger effektiv als ALA, wohingegen längere Reste (C5-C8) deutlich höhere Anreicherungen erzielen. So steigt der intrazelluläre PPIX-Gehalt mit steigender Kettenlänge bis zu einem Maximum bei C5/C6 an. Trotz



zunehmender Lipophilie nimmt die PPIX-Akkumulation ab dem Hexylester wieder ab. Das bedeutet, dass bei zu großer Lipophilie der Ester nach Eintritt in die Zellmembran dort zurückgehalten und nicht in das Zytosol eingeschleust wird<sup>[45]</sup>. Viele Faktoren beeinflussen also die Effektivität eines ALA-Derivats. Steigende Lipophilie führt zu einer verbesserten Biopermeabilität (Diffusion durch Zellmembran, Magen-Darmschleimhaut und Stratum Corneum). Bei zu großer Lipophilie kommt es andererseits zu einer Anreicherung in der Membran und die Verbindung gelangt nicht in das Mitochondrium, dem Ort der PPIX-Synthese. Idealerweise sollte das Derivat demzufolge sowohl lipophile wie hydrophile Eigenschaften in sich vereinen. Systemische (z.B. orale) Applikation erfordert eine Stabilität der ALA-Derivate gegen enzymatische Hydrolyse im Magen-Darmbereich, um eine Abspaltung der permeabilitätssteigernden Gruppen vor Eintritt in die Tumorzelle zu verhindern. Das Verfahren der Mikroverkapselung ist eine Möglichkeit hydrolyseempfindliche Arzneistoffe (z. B. Peptide, Proteine) durch Einbringen in bioabbaubare Polymere vor der Hydrolyse im GIT zu schützen und eine ausreichende Verfügbarkeit in der Zielzelle zu ermöglichen. Andererseits muss die Schutzfunktion des ALA-Derivats jedoch, in der Tumorzelle angelangt, möglichst rasch durch Enzyme (Esterasen, Amidasen) abgetrennt werden, um die PPIX-Synthese (ALA-Dehydrogenase etc.) in Gang zu setzen<sup>[46]</sup>. Die Geschwindigkeit dieser Enzymreaktionen wird in entscheidendem Maße von der Wechselwirkung zwischen Enzym und Substrat beeinflusst (räumliche Anordnung reaktiver Zentren, Ladungen etc.).

### 3.3 Transportmechanismus durch die Zellmembran

Ein limitierender Schritt bei der ALA-induzierten PPIX-Biosynthese ist der Transport durch die Zellmembran. Deshalb ist es von großem Interesse, die dabei ablaufenden Mechanismen aufzudecken, um maßgeschneiderte Verbindungen für die PDD und die PDT zu synthetisieren. Langkettige ALA-Ester werden schneller und leichter aufgenommen als die freie Säure. Die nötige Inkubationsdosis zum Erreichen eines bestimmten PPIX-Levels wird hierdurch um das 30-150fache erniedrigt, was wahrscheinlich auf unterschiedlichen Aufnahmemechanismen beruht. K. Berg et al.<sup>[47]</sup> postulierten für ALA einen aktiven Transport durch BETA- und GABA-Carrier, die den Transport der ALA strukturell ähnlicher Verbindungen  $\beta$ -Alanin, Taurin (BETA) und  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA) bewerkstelligen. Eine Aufnahmekinetik wurde anhand C14-gelabelter ALA an einer Adenokarzinom-Zelllinie (WiDr) verfolgt (Michaelis-Menten-Kinetik:  $K_m = 8-10$  mmol,  $V_{max} = 18-20$  nmol (mg Protein $\cdot$ h) $^{-1}$ ). Die Temperaturabhängigkeit der ALA-Aufnahme wurde in einem Temperaturbereich von 15-32°C bestimmt. Der Arrhenius-Plot ergab eine Aktivierungsenergie von 112 kJ/mol. Der ALA-Transport war  $Na^+$ - und in geringem Maße  $Cl^-$ -abhängig und wurde durch  $\beta$ -Aminosäuren ( $\beta$ -Alanin, Taurin) und  $\gamma$ -Aminosäuren ( $\gamma$ -Aminobuttersäure) gehemmt. Diese Ergebnisse sprechen für einen aktiven Transport von ALA. Im Gegensatz hierzu zeigten  $\beta$ -Aminosäuren keinerlei Einfluss auf die durch ALA-Methylester und ALA-Hexylester induzierte PPIX-Produktion. ALA wird also möglicherweise im Gegensatz zu ALA-Estern durch  $\beta$ - und  $\gamma$ -Aminosäure-Carriersysteme in die Zellen transportiert. Aufnahmekinetiken mit radiomarkierter ALA an einem *in vitro*-Modell des GIT zeigen, dass nach ALA-Inkubation bei unterschiedlich differenzierten Adenokarzinom-Zelllinien (G1-G3) sowie bei einer Kolonfibroblasten-Zelllinie vergleichbare intrazelluläre ALA-Mengen detektiert wurden, obwohl daraus signifikante zelllinienspezifische Unterschiede im PPIX-Level resultierten. Somit scheint bei ALA die PPIX-Biosynthese und nicht die ALA-Aufnahme entscheidender Faktor für eine tumorselektive PPIX-Akkumulation zu sein, was durch Nachweis einer im Vergleich zu den Fibroblasten erhöhten Porphobilinogen-Deaminase-Aktivität und einer erniedrigten Ferrochelatase-Aktivität in den Karzinomzelllinien bestätigt wurde. Eine analoge Un-

tersuchung mit radiomarkierten ALA-Estern an unterschiedlich differenzierten Karzinomzelllinien und Fibroblasten wurde bisher noch nicht durchgeführt. Bei dem Vergleich zwischen ALA und ALA-Ester bedingt die unterschiedliche zelluläre Aufnahme und nicht die PPIX-Biosynthese die extremen Unterschiede in der PPIX-Akkumulation.

Bei der Diskussion der drastischen Unterschiede in der PPIX-Akkumulation nach Gabe verschiedener ALA-Ester muss sowohl die zelluläre Aufnahme als auch die enzymatische Esterhydrolyse berücksichtigt werden. Eine Aufnahmekinetik unterschiedlich strukturierter radiomarkierter Ester könnte dazu einen entscheidenden Beitrag leisten.

### 3.4 ALA-Dehydrogenase

Wie in Kapitel 1.5 beschrieben, katalysiert die ALA-Dehydrogenase (ALA-D) die Kondensation von zwei Molekülen ALA zu Porphobilinogen (PBG). Dies ist ein wichtiger Schritt bei der Porphyrinbiosynthese (Abb. 4). Als Bestandteil der Hämoproteine, Chlorophylle und des Cobalamins (Vitamin B12) spielen die Porphyrine in vielen essenziellen Lebensvorgängen eine wichtige Rolle. Porphyrin-Eisenkomplexe sind als prosthetische Gruppen der Cytochrome, Peroxidasen und des Hämoglobins für den Elektronen- und Sauerstofftransport im Körper unentbehrlich. Bei der Photosynthese ermöglichen Porphyrin-Magnesiumkomplexe im Chlorophyll durch Lichtabsorption die ATP-Bildung und im Vitamin B12 katalysiert ein Porphyrin-Kobaltkomplex Isomerisierungs-, Gruppenübertragungs- und Redoxreaktionen. ALA-D (E.C. 4.2.1.24) ist aufgrund der universellen Bedeutung bei der Porphyrinbiosynthese in sehr vielen Organismen vorhanden und wurde bereits aus Bakterien, Pflanzen und Tieren isoliert. Zwei Jahre nach der erstmaligen Isolierung aus Hühnererythrocyten durch Granick im Jahre 1954 erkannten Dressel und Falk, dass ALA-D schon durch minimale Bleimengen signifikant in ihrer Aktivität gehemmt wird. So können mittels einer ALA-D-Aktivitätsbestimmung der Blutbleispiegel untersucht und beginnende Bleiintoxikationen erkannt werden<sup>[48]</sup>.

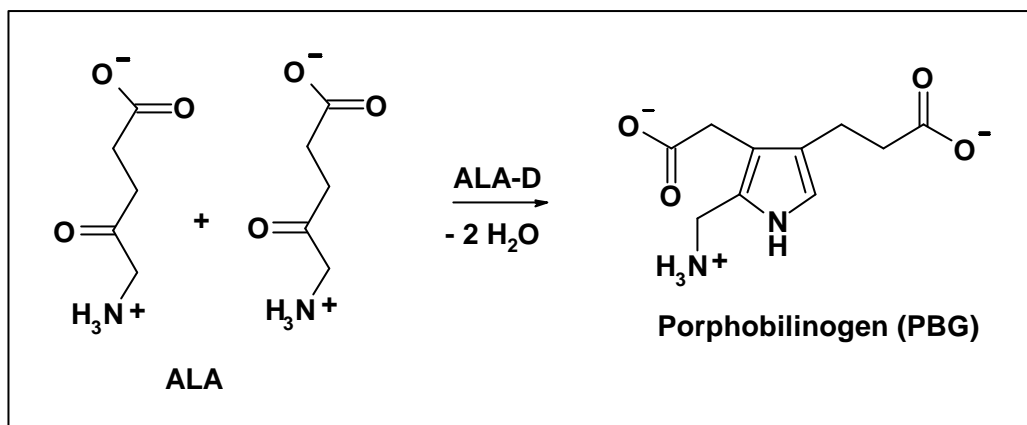
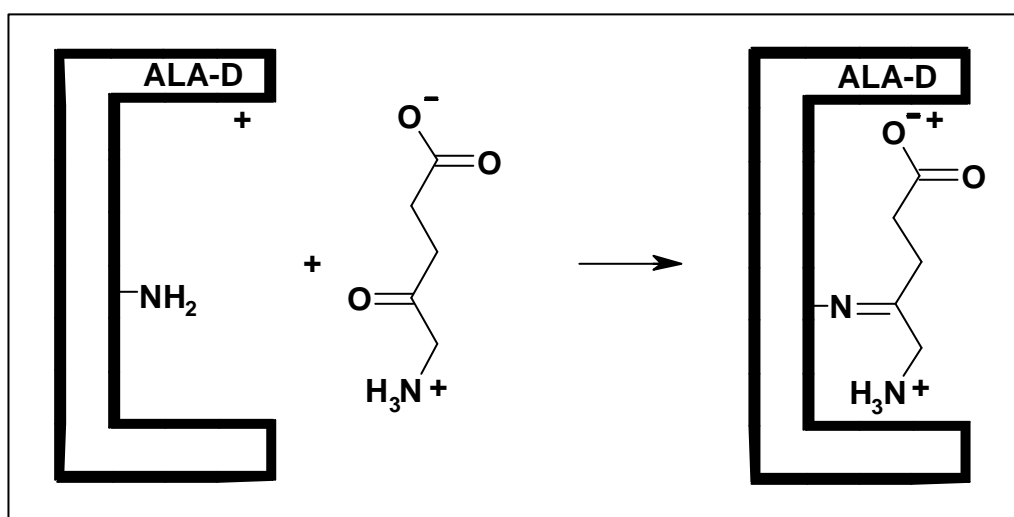


Abbildung 4: Porphobilinogen-Bildung

ALA-D ist ein Zinkenzym, das aus acht identischen Untereinheiten besteht und zwei unterschiedliche Substratbindungsstellen besitzt. Charakteristisch ist, dass das Enzym zum Erreichen der vollen Aktivität Disulfidbrücken-reduzierende Agenzien (Thiolaktivatoren) wie Glutathion oder Cystein benötigt. Thiolgruppen-alkylierende Verbindungen oder SH-gruppenspezifische Hemmstoffe (Hg, Pb) hingegen bewirken eine Aktivitätshemmung. Alle ALA-Dehydrogenasen von Säugetieren besitzen zwei aktive Zentren (A und P). Im ersten Schritt der PBG-Synthese kommt es zu einer Schiff-Basenreaktion zwischen der Aminogruppe eines Lysinseitenrests von ALA-D (P-Seite) und der Ketofunktion des ersten ALA-Moleküls (Abb. 5).

Abbildung 5: Bindung des ersten ALA-Moleküls an das P-Zentrum von ALA-D<sup>[49]</sup>

Dieser Teil stellt später den „Propionatseitenarm“ des PBG dar (P: Propionat). Dies ermöglicht dem zweiten aktiven Zentrum (A: Acetat) ein weiteres Molekül ALA zu binden, das den „Acetatseitenarm“ im entstehenden PBG bildet. Eine Stabilisierung des Enzym-Substratkomplexes erfolgt durch Coulomb-Wechselwirkung zwischen einem positiven Enzymzentrum und dem negativen Carboxylatrest von ALA<sup>[49]</sup>. Bei ALA-Estern fehlt diese stabilisierende Wechselwirkung (kein freier Carboxylrest), was die Bildung eines stabilen Komplexes und somit die anschließende Kondensation erschwert.

### 3.5 Syntheseplanung

Sowohl der Transport durch die Zellmembran als auch die anschließenden Enzymreaktionen stellen große Ansprüche an die verwendeten Substrate. So gilt es, ideale Strukturen zu erkennen und diese synthetisch zu verwirklichen. Der ALA-Hexylester und der ALA-Benzylester haben sich in zahlreichen *in vivo*- und *in vitro*-Untersuchungen als besonders erfolgreich herausgestellt. Ausgehend von diesen Leitstrukturen wurden zahlreiche neue ALA-Ester synthetisiert.

- Diaminokomponenten wurden über Ester bzw. Amidbindungen an ALA geknüpft. Nach der enzymatischen Hydrolyse könnten die freigesetzten Diaminofragmente als Eisen-Komplexbildner dienen und somit, wie in Kapitel 1.5.1 beschrieben, eine Steigerung der PPIX-Produktion bewirken.
- ALA wurde mit Oxaalkylketten verschiedener Länge und unterschiedlichem Verhältnis unpolarer CH<sub>2</sub>-Gruppen und polarer Sauerstoffatome (C/O: 2,5, 3, 4, 5) versehen. Solche Oxaalkylgruppen werden an Moleküle angebracht, um deren Lipophilie und die damit verbundene Membranpermeabilität zu verändern.
- Des Weiteren wurde ALA mit geradkettigen Alkoholen mit unterschiedlichem Fluorierungsgrad und unterschiedlicher Kettenlänge (C<sub>4</sub>H<sub>2</sub>F<sub>7</sub>,

$C_5H_3F_8$ ,  $C_6H_4F_9$ ,  $C_7H_2F_{13}$ ) verestert. Die elektronenziehenden Substituenten sollten eine Aktivierung der Esterbindung und dadurch eine raschere PPIX-Produktion bewirken.

- Thiocarbonsäure-S-ester weisen gegenüber ihren Sauerstoff-Analoga eine höhere Reaktivität auf, wovon in biologischen Systemen in vielfältiger Weise Gebrauch gemacht wird (z.B. Acetyl-CoA). Es wurde der dem Hexylester analoge ALA-Thiohexylester synthetisiert. Nach enzymatischer Hydrolyse könnte das freiwerdende Thiol zu einer Aktivierung der ALA-Dehydrogenase und somit zu einer Steigerung der PPIX-Akkumulation führen (Thiolaktivierung der ALA-D, vgl. Kapitel 1.5.1).
- Neben dem ALA-Phenylester wurden aktivierte ALA-Benzylester mit elektronenziehenden Gruppen ( $F$ ,  $CF_3$ ,  $4xF$ ,  $5xF$ ,  $NO_2$ ) synthetisiert, um den Substituenteneinfluss auf die PPIX-Produktion zu untersuchen.
- Die Synthese von ALA-Oligoestern stellt eine weitere Möglichkeit zur Steigerung der PPIX-Akkumulation dar. Es wurde die Idee verfolgt, in einem Molekül mehrere ALA-Einheiten zu binden, damit bei der intrazellulären Hydrolyse nicht nur ein, sondern mehrere ALA-Moleküle zur PPIX-Biosynthese zur Verfügung stehen. Da sowohl der Transport durch die Zellmembran als auch die anschließende Hydrolyse in hohem Maße von der Größe und den sterischen Ansprüchen des Moleküls abhängen, wurden möglichst einfache ALA-Diester bzw. ein ALA-Tetraester synthetisiert. Als Alkoholbrücken dienten hierbei Glykol, der 1,4-Dibenzylalkohol als Analogon zum Benzylester sowie als einfache Tetrahydroxyverbindung Pentaerythrit.
- Als Vergleichssubstanzen für die *in vitro*-Testung wurden der ALA-Hexylester und der ALA-Benzylester synthetisiert.

### 3.5.1 Synthese von 5-Aminolävulinsäureestern mit Thionylchlorid

In einem japanischen Patent<sup>[50]</sup> vom Jahre 1992 wurde ein einfacher einstufiger Syntheseweg zur Darstellung von ALA-Estern mit Thionylchlorid vorgestellt. Dabei wird ALA **1** in dem zu veresternden Alkohol gelöst und unter Eiskühlung durch Zutropfen von Thionylchlorid zum Ester umgesetzt (Abbildung 6). Nach Umkristallisation erhält man die ALA-Ester-hydrochloride in guten Ausbeuten. Nach dieser Methode wurden Ester **2-9** synthetisiert (Abb. 6). Diese Synthesemethode ist jedoch in ihrer Anwendbarkeit sehr beschränkt, da der zu verwendende Alkohol als Lösungsmittel dient und im Überschuss eingesetzt werden muss. So können nur flüssige Alkohole mit nicht zu hohem Siedepunkt verwendet werden (problematische Reinigung z.B. der Ethylenglykolderivate).

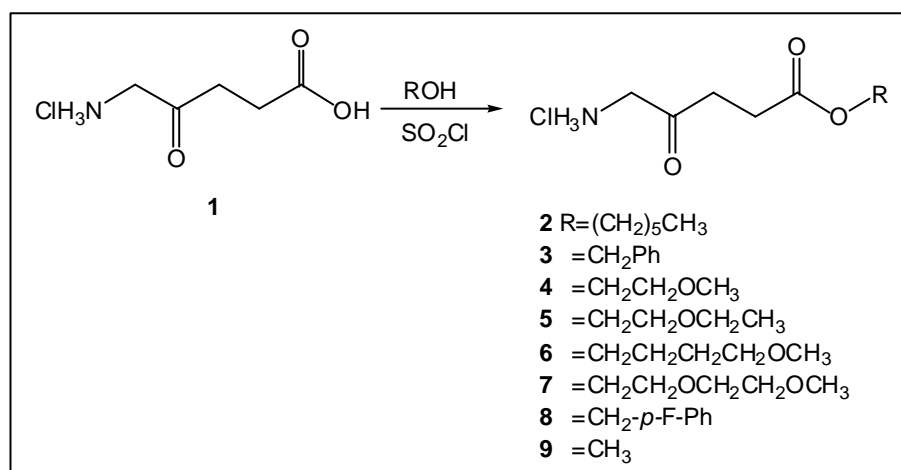


Abbildung 6: ALA-Estersynthese mit Thionylchlorid<sup>[49]</sup>

Zudem muss eine ausreichende Löslichkeit von ALA im gewählten Alkohol gewährleistet sein, was oftmals nicht der Fall ist. Somit ist die Veresterung mit Thionylchlorid, die bisher als Standardsynthesemethode für ALA-Ester in der Literatur auftaucht, nicht geeignet, um eine systematische Synthese unterschiedlich substituierter Ester durchzuführen. Um dies zu erreichen, muss zunächst die Aminogruppe von ALA geschützt werden. Dies ist einerseits nötig, um eine ausreichende Löslichkeit in organischen Solvenzien zu gewährleisten. Andererseits ist die Schutzgruppentechnik analog der Peptidchemie unbedingt erforderlich, um eine gezielte Veresterung ohne mögliche Konkurrenzreaktionen (Amidbildung) zu erzielen.

### 3.5.2 Schutz der Aminofunktion von 5-Aminolävulinsäure

Zur Blockierung der Aminofunktion bei organischen Synthesen steht eine Vielzahl von Schutzgruppen zur Verfügung. Anwendung findet die Schutzgruppenchemie immer dann, wenn mehrere funktionelle Gruppen in einem Molekül um einen Reaktionspartner konkurrieren und somit eine gezielte Reaktion ohne Nebenprodukte nicht möglich ist. Häufig wird die Schutzgruppentechnik zur Darstellung von Naturstoffen, wie z.B. Peptiden, Alkaloiden und Nukleotiden, verwendet. Entscheidende Kriterien für die Wahl einer Schutzgruppe sind neben der Methode der Einführung, ihre Stabilität während der Reaktionssequenz und die Leichtigkeit ihrer Abspaltung. Besonders in der Peptidchemie kommt sehr häufig die BOC-Schutzgruppe zur Anwendung. Sie ist einerseits in einem weiten pH-Bereich (4-12) stabil und kann andererseits unter sauren Bedingungen (Trifluoressigsäure, HCl-gesättigte Essigesterlösung etc.), bei denen noch keine Esterhydrolyse zu befürchten ist, abgespalten werden. Dabei tritt der *tert*-Butyloxycarbonylrest unter Bildung zweier gasförmiger Produkte, Isobuten und Kohlendioxid, aus.

5-Aminolävulinsäurehydrochlorid **1** wurde in Wasser gelöst, mit 2N NaOH ein pH-Wert von 8.5 eingestellt und anschließend mit BOC-Anhydrid versetzt. Nach Ablauf der Reaktion und entsprechender Aufarbeitung wurde BOC-geschützte 5-Aminolävulinsäure **10** isoliert (Abb.7).

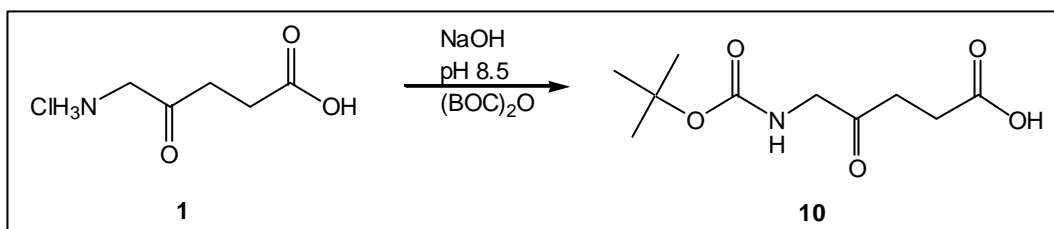


Abbildung 7: Synthese von BOC-5-Aminolävulinsäure **10**<sup>[51]</sup>

Des Weiteren wurde die Aminogruppe der 5-Aminolävulinsäure mit einer Phthal-Schutzgruppe versehen. Hierzu wurde zunächst Tetrahydrofurfurylamin mit Phthalsäureanhydrid zu N-Tetrahydrofurfurylphthalimid umgesetzt. Im nächsten Schritt erfolgte eine oxidative Öffnung des Tetrahydrofuranrings, wobei nach entsprechender Aufarbeitung 5-Aminolävulinsäurephthalimid **11** isoliert werden konnte (Abb. 8).



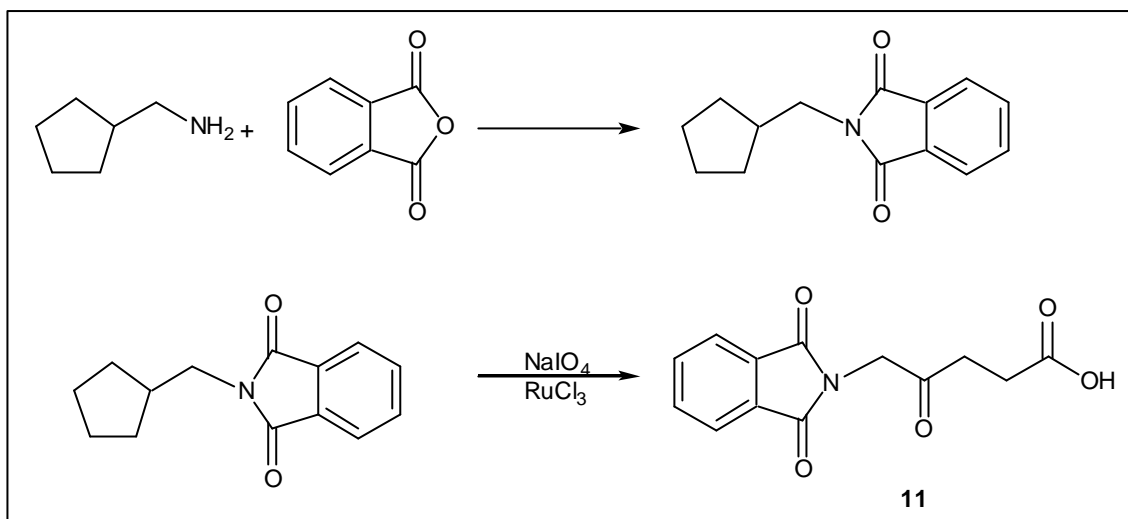


Abbildung 8: Synthese von 5-Aminolävulinsäurephthalimid **11**<sup>[52]</sup>

### 3.5.3 Veresterung durch EDC-Kupplung

In der Peptidsynthese spielt die in situ-Aktivierung von Carbonsäuren mit Carbodiimiden (z.B. DCC) eine große Rolle. Durch Addition der Carbonsäure an die C/N Doppelbindung dieser Reagenzien entstehen sogenannte O-Acylisoharnstoffe. Erwartungsgemäß reagieren diese mit guten Nucleophilen (Alkohole, Amine, etc.) am Carboxylkohlenstoff des Carbonsäureteils zu den entsprechenden Produkten (Ester, Amide ...)<sup>[53]</sup>. Um diese Methode in der Synthese für ALA-Ester einzusetzen, muss zunächst die Aminofunktion von ALA geschützt werden, um eine Amidbildung zu unterbinden. BOC-Aminolävulinsäure **10** ist im Gegensatz zu ALA **1** in organischen Solvenzien ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  etc.) sehr gut löslich und kann mit 1-Ethyl-3-[3-(dimethylamino)propyl]carbodiimid-hydrochlorid (EDC: wasserlösliches Carbodiimid) und einem Alkohol zum entsprechenden BOC-geschützten Ester umgesetzt werden (Abb. 9).

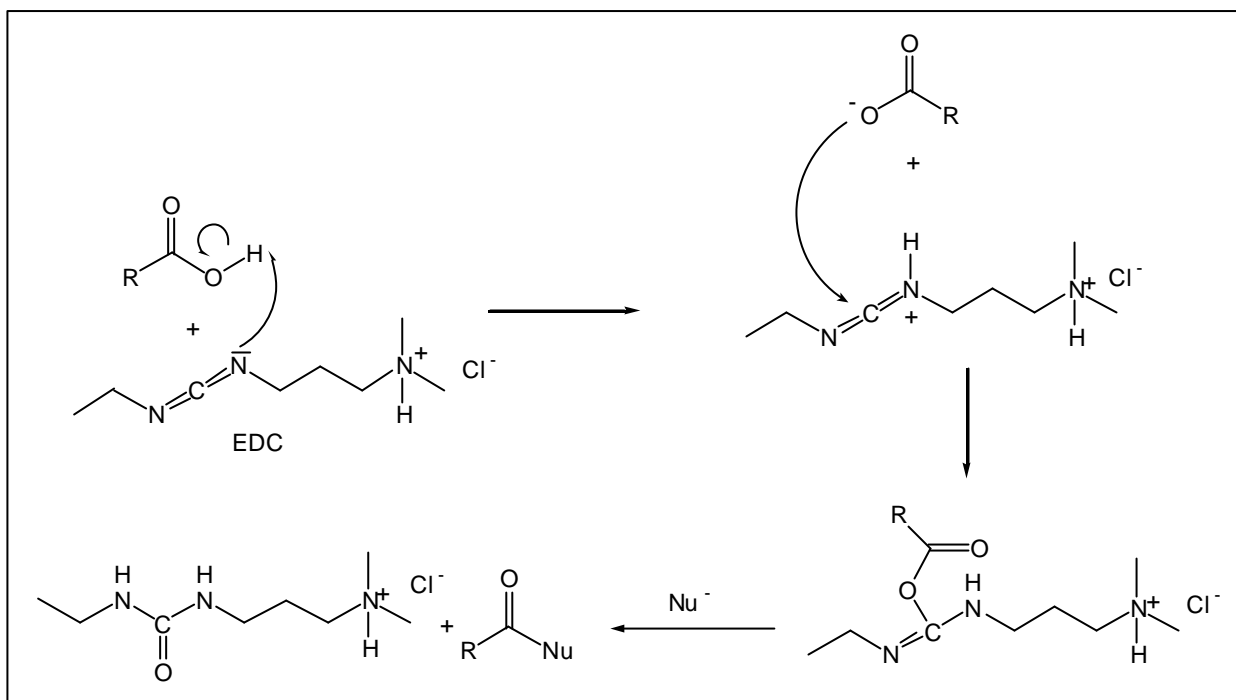
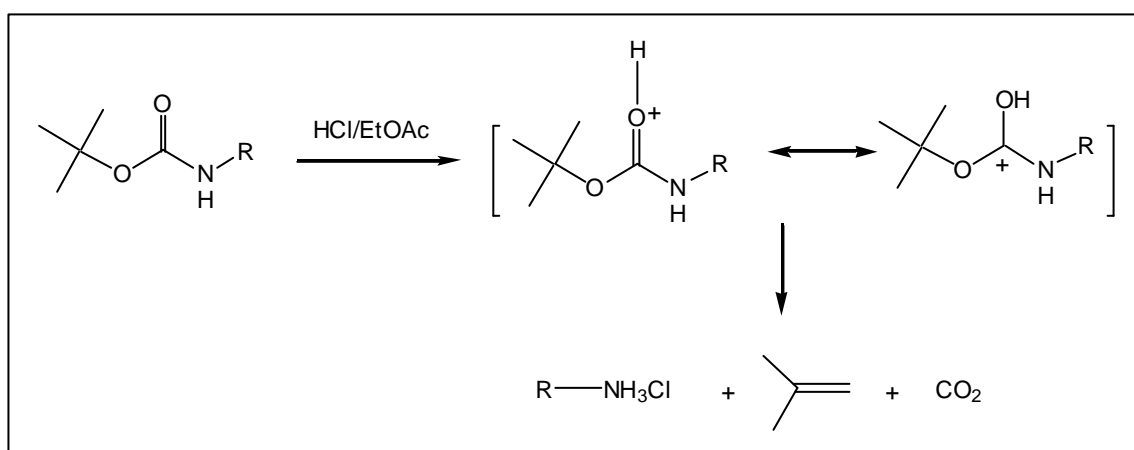


Abbildung 9: Mechanismus der Estersynthese durch EDC-Kupplung

Um wasserlösliche Verbindungen zu erhalten, müssen nach der Veresterung die BOC-Schutzgruppen abgespalten werden. Hierzu wird die geschützte Verbindung in Essigester gelöst und anschließend unter Eiskühlung mit einer HCl-gesättigten Essigesterlösung ca. 30 Minuten gerührt. Bei Erwärmen auf Raumtemperatur treten die *tert*-Butyloxycarbonyl-Reste unter Bildung zweier gasförmigen Produkte (Kohlendioxid und Isobuten) aus.

Abbildung 10: Entfernen der BOC-Schutzgruppe<sup>[54]</sup>

Die vollständige Entschützung wird anhand DC-Kontrolle (Ninhydrinfärbung) überprüft. Die entsprechenden Hydrochloride fallen als weiße Niederschläge aus und wer-



Einheiten vergleichbare Fluoreszenzwerte und das Dendrimer mit 18 ALA-Einheiten etwa doppelt so hohe Fluoreszenzwerte wie ALA. Die erhoffte deutliche Steigerung der induzierten Fluoreszenz mit steigender Anzahl der gebundene ALA-Moleküle konnte demzufolge nicht beobachtet werden. Ausgehend von diesen Ergebnissen erhielten bei der Auswahl geeigneter Oligoester einfache Strukturen den Vorzug vor größeren Systemen. Es wurden zwei ALA-Diester (Diglykolester **22**, Abb. 12, Dibenzylester **23**, Abb. 13) und ein ALA-Tetraester **24** (Abb. 14) synthetisiert. Intrazelluläre Esterhydrolyse führt somit zur Freisetzung von zwei bzw. vier ALA-Molekülen pro eingeschleuster Einheit, was eine erhöhte PPIX-Akkumulation im Vergleich zu den Monoestern zur Folge haben könnte. Besonderes Augenmerk liegt hierbei auf dem ALA-Dibenzylester **22**, der als Grundstruktur die erfolgreiche Benzylesterstruktur aufweist.

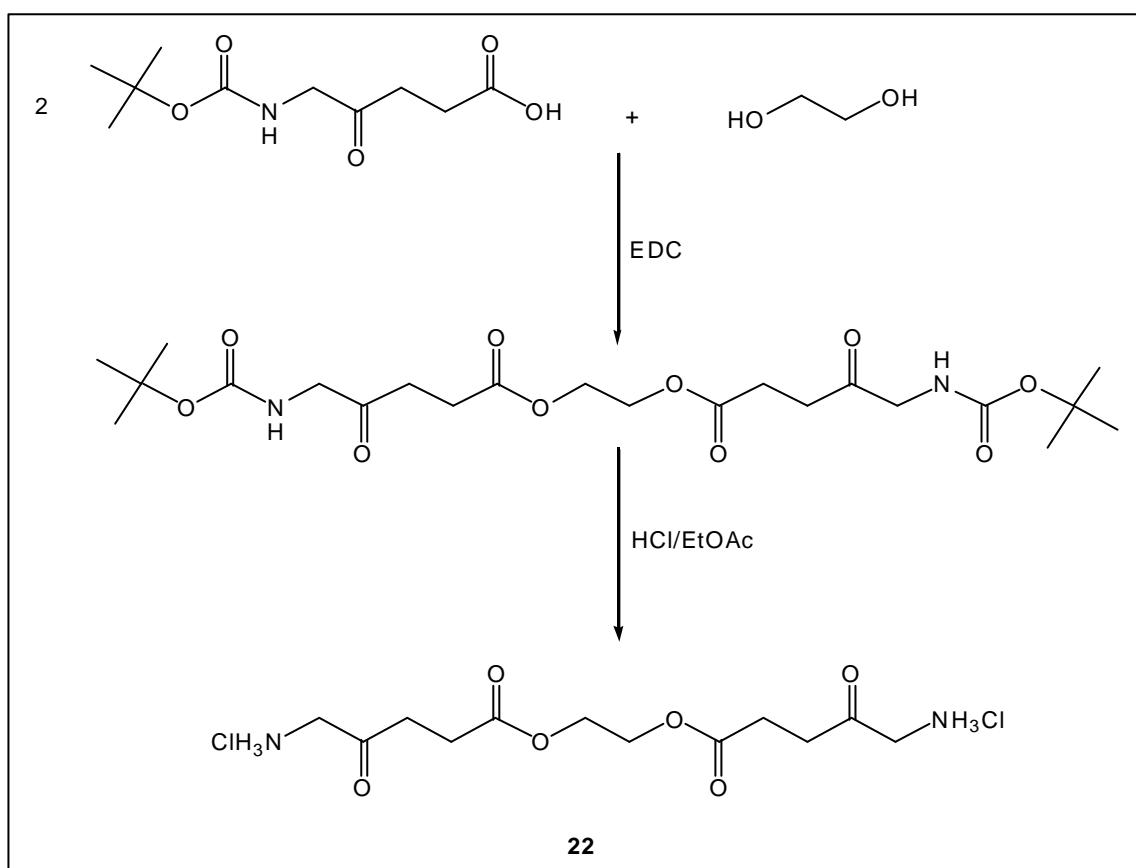
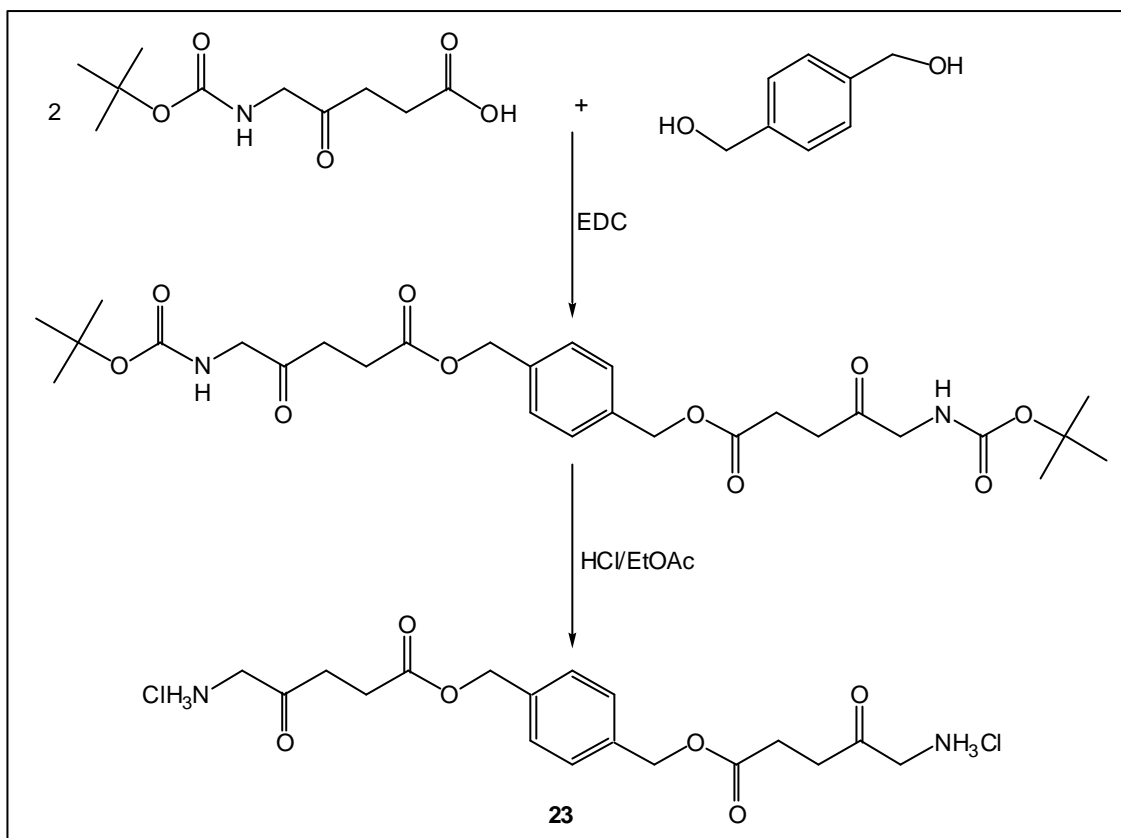
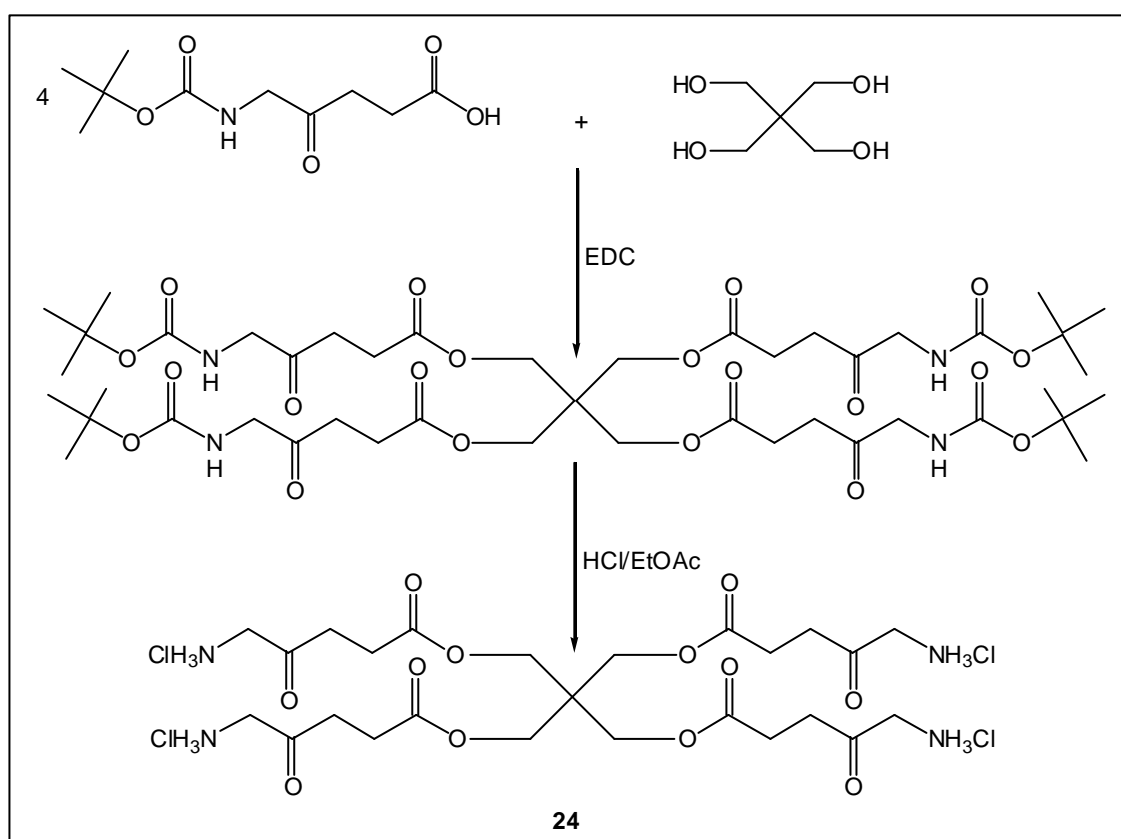


Abbildung 12: Synthese von Bis-ALA-diglykoldiester-dihydrochlorid **22**

Abbildung 13: Synthese von Bis-ALA-1,4-dibenzyl-diester-dihydrochlorid **23**Abbildung 14: Tetrakis-ALA-pentaerythritol-tetraester-tetrahydrochlorid **24**

### 3.5.5 Synthese von 5-Aminolävulinsäure-Diaminoderivaten

Bei der PPIX-Bioynthese wird durch die so genannte Feedback-Kontrolle die intrazelluläre ALA-Synthese gesteuert. Das Enzym Ferrochelatase katalysiert die Einlagerung von Eisen in PPIX, wodurch Häm gebildet wird. Eine Verringerung der intrazellulären Eisenkonzentration durch Komplexierungsreaktionen führt zu einer Steigerung der PPIX-Akkumulation.

*In vitro*-Tests <sup>[57, 58]</sup> zeigen, dass die PPIX-Anreicherung in Karzinomzelllinien durch Zugabe von Eisen-Chelatkomplexbildnern wie z. B. EDTA oder DEF (Deferoxamin) deutlich erhöht werden kann. Sehr fraglich ist jedoch, ob *in vivo* nach der Applikation einer Mischung aus ALA und dem Komplexbildner der Ligand in die Tumorzellen gelangt, um dort die gewünschte Steigerung der PPIX-Akkumulation zu bewirken. Die Verknüpfung eines Chelatliganden wie z.B. eines Diaminoalkohols oder einer Diaminosäure mit ALA über eine Ester- bzw. Amidbindung könnte zu einer Anreicherung des ALA-Diaminoderivats im kranken Gewebe führen. Nach Abspaltung des Diaminofragments durch intrazelluläre Esterasen bzw. Amidasen sollte die Eisen-Komplexierung eine Steigerung der PPIX-Akkumulation bewirken.

#### 3.5.5.1 Synthese von Di-BOC-geschützten Diaminoverbindungen

Als Diaminofragmente wurden 1,3-Diaminopropanol, 3,4-Diaminobenzoessäure und 2,3-Diaminopropionsäure verwendet. Bei der Komplexierung von intrazellulärem Eisen sollten sich somit stabile Fünf- und Sechsringsysteme bilden. Die Diaminokomponenten werden vor der Kupplung mit ALA zum Ester bzw. Amid zunächst mit BOC-Schutzgruppen versehen. Dabei kommen unterschiedliche Methoden zur Anwendung. 1,3-Diamino-2-propanol und 2,3-Diaminobenzoessäure werden geschützt, indem man sie zusammen mit Di-*tert*-butyldicarbonat (BOC-Anhydrid) in Methanol bei Raumtemperatur rührt. Unter Gasentwicklung (Kohlendioxid und Isobuten) erhält man nach Umkristallisation 1,3-Di-BOC-diamino-2-propanol und 3,4-Di-BOC-diaminobenzoessäure als farblose Feststoffe (Abb. 15, 16).

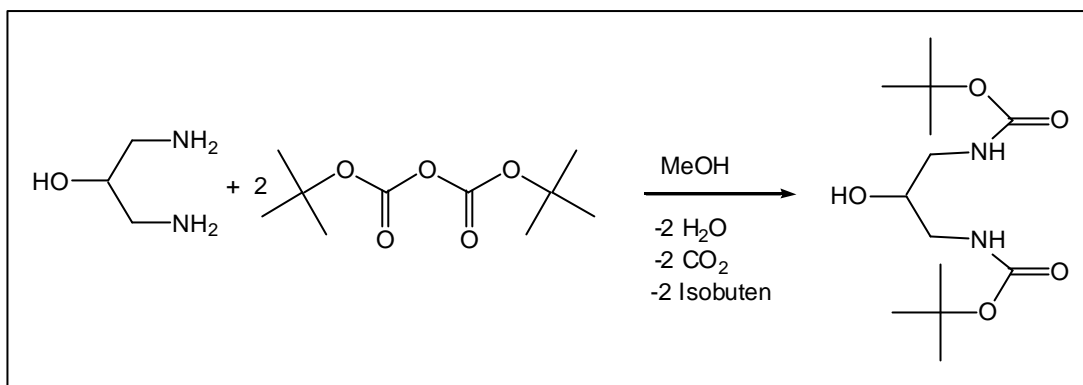


Abbildung 15: Synthese von 1,3-Di-BOC-diamino-2-propanol

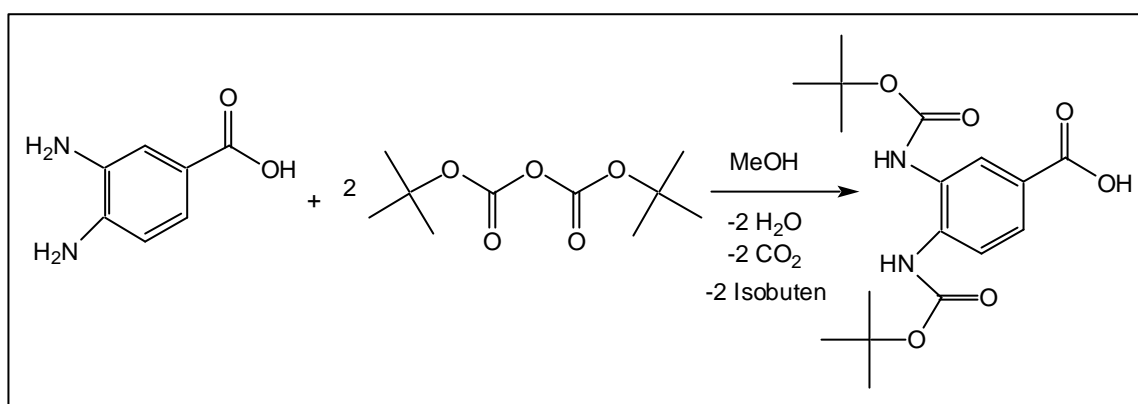


Abbildung 16: Synthese von 3,4-Di-BOC-diaminobenzoessäure

Das käufliche DL-2,3-Diaminopropionsäure-monohydrochlorid ist ein nur in Wasser löslicher Naturstoff, der in Mimosaceen, der Familie der Mimosen, vorkommt<sup>[59]</sup>. Um bei der anschließenden Amidsynthese die Bildung von Nebenprodukten zu verhindern und die freie Säure in ein organisches Lösungsmittel zu überführen, maskiert man die beiden Aminofunktionen mittels *tert*-Butyloxycarbonylazid (Abb. 17). Letzteres wird durch Umsetzung von *tert*-Butylcarbazat mit Salzsäure und Natriumnitrit hergestellt<sup>[60]</sup>. Dabei wird das entstehende Azid nicht isoliert, sondern sofort mit DL-2,3-Diaminopropionsäurehydrochlorid umgesetzt. In einem Gemisch aus Dioxan, Wasser und Triethylamin erfolgt dann unter Abspaltung von Stickstoffwasserstoffsäure die Einführung der BOC-Schutzgruppen innerhalb von 24 Stunden<sup>[61]</sup>.

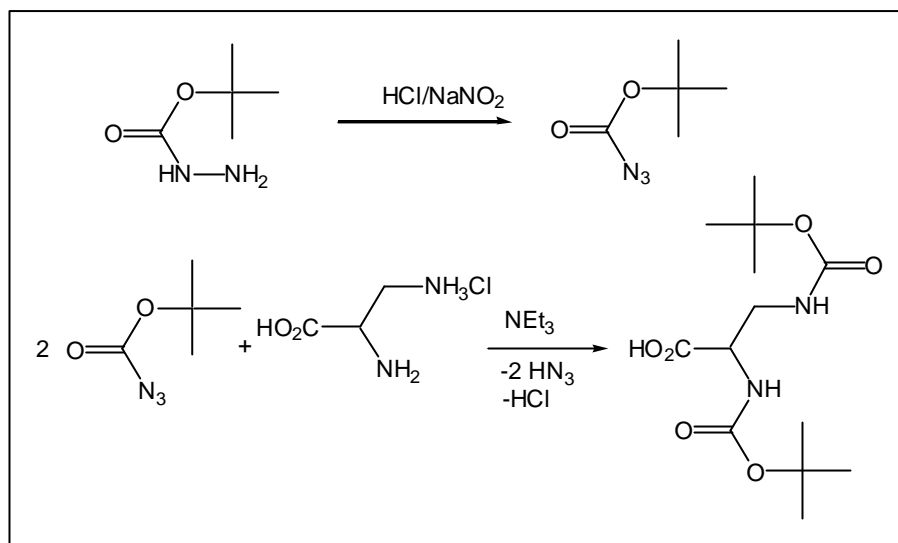


Abbildung 17: Synthese von *N,N'*-Di-BOC-DL-2,3-diaminopropionsäure

Durch Ausschütteln mit Ether entfernt man Azidreste, säuert mit Zitronensäure an und extrahiert *N,N'*-Di-BOC-DL-2,3-diaminopropionsäure mit Ether. Nach Umkristallisation aus Ether/Petrolether (40/60) erhält man einen farblosen Feststoff.

### 3.5.5.2 Synthese von 5-Aminolävulinsäure-1,3-diaminopropylestern

Geschützte Aminolävulinsäure wird mit Di-BOC-diaminopropanol mit EDC zum entsprechenden Ester umgesetzt. Nach Entfernen der BOC-Schutzgruppen erhält man die ALA-diaminopropylester **25** und **26** als farblose Feststoffe (Abb. 18, 19).

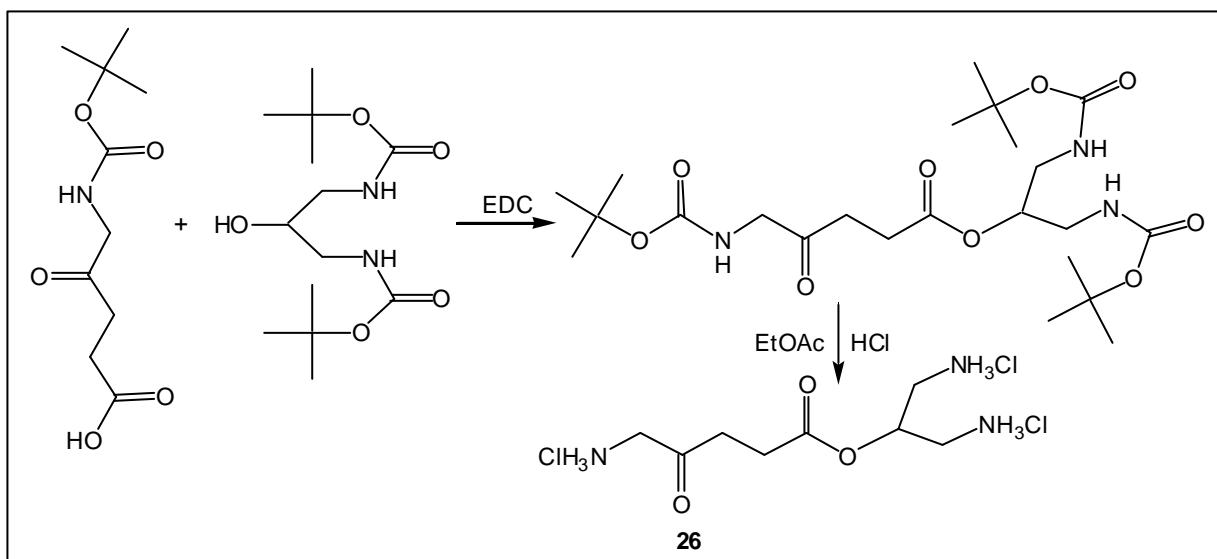


Abbildung 18: Synthese von ALA-1,3-diaminopropylester-trihydrochlorid **25**



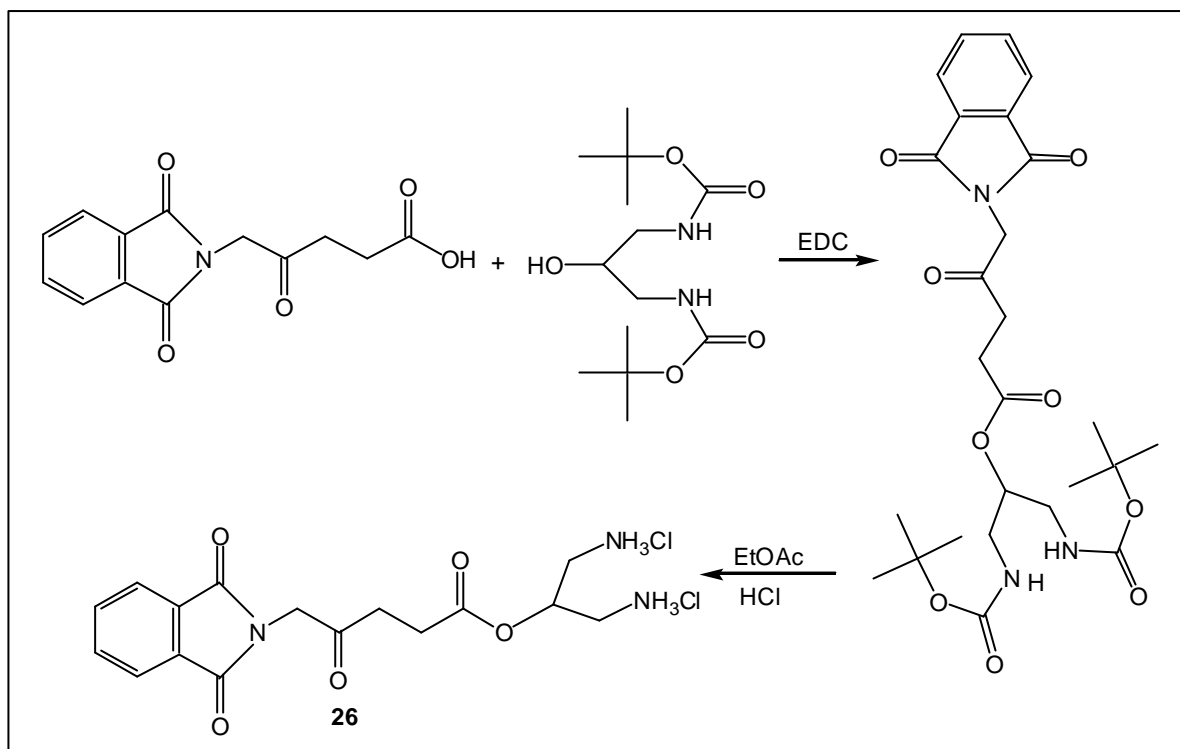
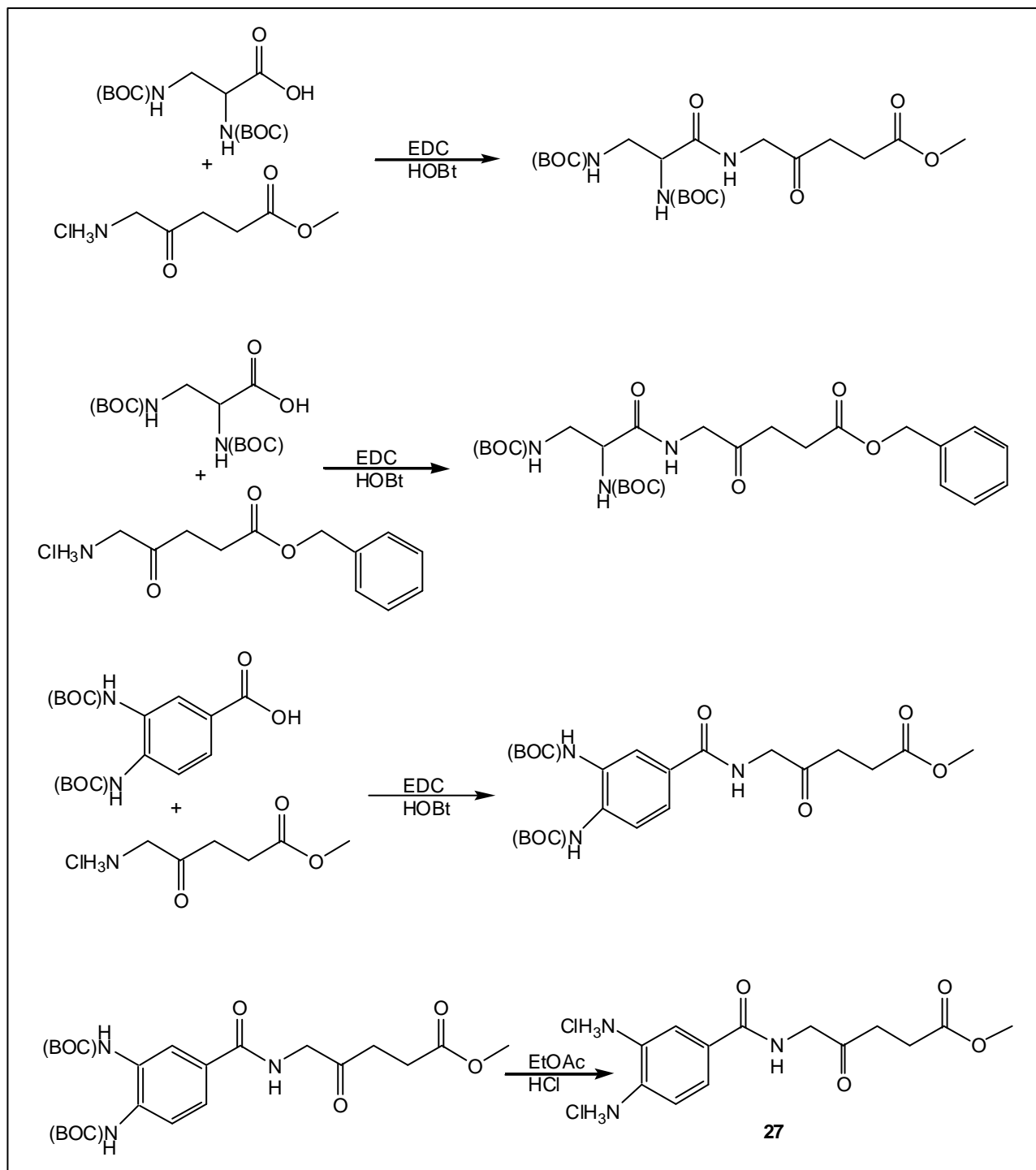


Abbildung 19: Synthese von Pht-ALA-1,3-diaminopropylester-dihydrochlorid **26**

### 3.5.5.3 Kupplung von 5-Aminolävulinsäureestern mit Diaminocarbonsäuren

Die geschützten Diaminosäuren werden nach Aktivierung mit Hydroxybenzotriazol (HOBt) und EDC mit ALA-Benzylester **3** oder ALA-Methylester **9** zum entsprechenden geschützten Amid umgesetzt (Abb. 20). Nach Entfernen der BOC-Schutzgruppen isoliert man ALA-Methylester-3,4-diaminobenzoessäureamid-dihydrochlorid **27** als hygroskopischen, farblosen Feststoff. Hingegen konnten beim Entschützen der beiden 2,3-Diaminopropionsäureamide nicht die gewünschten Produkte isoliert werden. Auch eine Variation der Reaktionsbedingungen (THF/HCl, -70°C; Trifluoressigsäure) brachte keinen Erfolg.

Abbildung 20: Kupplung von ALA mit Di-BOC-diaminosäuren<sup>[51]</sup>

## 4 Spektroskopische Untersuchungen

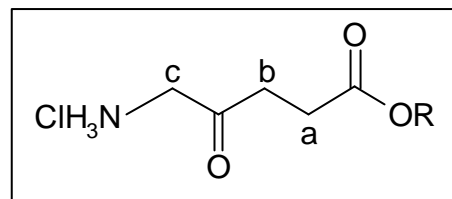
### 4.1 Massenspektroskopie

Bei den massenspektroskopischen Untersuchungen kommen unterschiedliche Methoden zur Anwendung. Die Ionenerzeugung bei thermisch verdampfbaren Molekülen erfolgt durch *Elektronenstoß-Ionisation (EI)*. Dabei werden aus einer Glühkathode Elektronen mit einer Energie von ca. 70 eV auf das Zielmolekül geschossen, wodurch neben Ionisationen auch Fragmentierungen auftreten. Hierbei entstehen meist Radikalkationen, die im Spektrum als Peak entsprechender Massenzahl erscheinen<sup>[62]</sup>. Bei der *Chemischen Ionisation (CI)* kommt es zunächst durch Elektronenstoß zur Ionisation des so genannten Plasmagases, wobei die dabei entstehenden Radikalkationen (z.B.  $\text{NH}_3^{+\bullet}$ ) zur Bildung von positiven Molekülionen führen, die sich durch Zerfallsreaktionen stabilisieren. Vorteilhaft ist, dass im Vergleich zu EI weniger Fragmentierungen auftreten<sup>[63]</sup>. Nach Einbettung der Substanz in eine Matrix wird diese bei der *FAB-Spektroskopie (Fast-Atom-Bombardment)* mit  $\text{Cs}^+$ -Ionen beschossen, wobei ionische Verbindungen durch eine von auftreffenden Teilchen ausgelöste Stoßkaskade in die Gasphase gebracht werden. So ergeben sich die Molekülmassen bei Spektren positiver Ionen aus den intensiven  $[\text{MH}]^+$ -Signalen. Bei den untersuchten Verbindungen treten neben dem Molekülpeak aufgrund von Fragmentierungen auch eine Reihe weiterer Peaks unterschiedlicher Intensität auf. Bei den Hydrochloriden konnte das durch HCl-Abspaltung entstehende  $[\text{MH}-\text{HCl}]^+$ -Fragment detektiert werden. Die BOC-geschützten Ester liefern neben dem  $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ -Signal das aus der Abspaltung der *tert*-Butylgruppe resultierende  $[\text{M}-\text{C}_4\text{H}_8+\text{NH}_4]^+$ -Signal.

### 4.2 Kernresonanzspektroskopie

Die synthetisierten ALA-Ester weisen relativ einfache  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren auf, die sich aufgrund der verschiedenen Alkoholreste unterscheiden. So zeigen alle die für ALA charakteristischen Signale. Im Bereich von 2.50-2.90 ppm tritt das AA`BB`-

Spinsystem der zwei benachbarten CH<sub>2</sub>-Gruppen a und b auf. Bei etwa 4.00 ppm erscheint das zur CH<sub>2</sub>-Gruppe c gehörige Signal. Als Lösungsmittel wurden für die geschützten Verbindungen CDCl<sub>3</sub>



und die entschützten Hydrochloride CDCl<sub>3</sub> oder D<sub>2</sub>O verwendet. Der Syntheseweg der ALA-Ester mittels EDC-Kupplung soll am Beispiel des Bis-ALA-1,4-dibenzylesterdihydrochlorids **23** exemplarisch dargestellt werden. Abbildung 21 zeigt das <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum des BOC-geschützten Dibenzylesters in CDCl<sub>3</sub>. Neben dem Singulett der BOC-Schutzgruppen bei 1.45 ppm sind die für ALA typischen Signale der Methylengruppen a, b und c zu erkennen. Das Singulett der beiden Benzylgruppen liegt bei 5.01 ppm und bei 5.19 ppm ist das breite Singulett der Amidprotonen zu erkennen. Dem Singulett bei 7.31 ppm kann das aromatische AA'BB'-System zugeordnet werden. In Abbildung 22 ist das <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum des Bis-ALA-1,4-dibenzylesterdihydrochlorids **23** in D<sub>2</sub>O dargestellt. Das Singulett der BOC-Schutzgruppen sowie das breite Amidsignal sind verschwunden. Das AA'BB'-System der beiden Methylengruppen a und b bei 2.64 und 2.81 ppm ist deutlich zu erkennen.

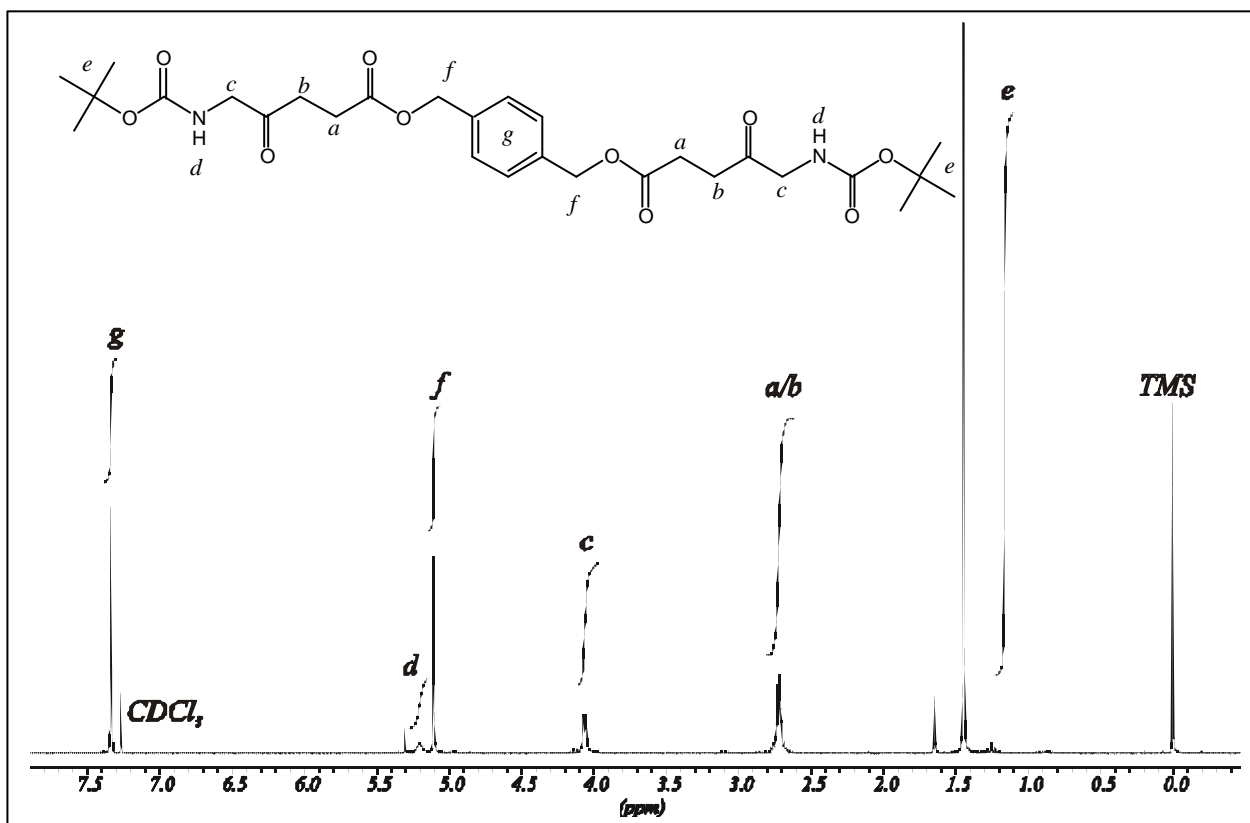


Abbildung 21: <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum von Di-BOC-Bis-ALA-1,4-dibenzyl diester in CDCl<sub>3</sub>

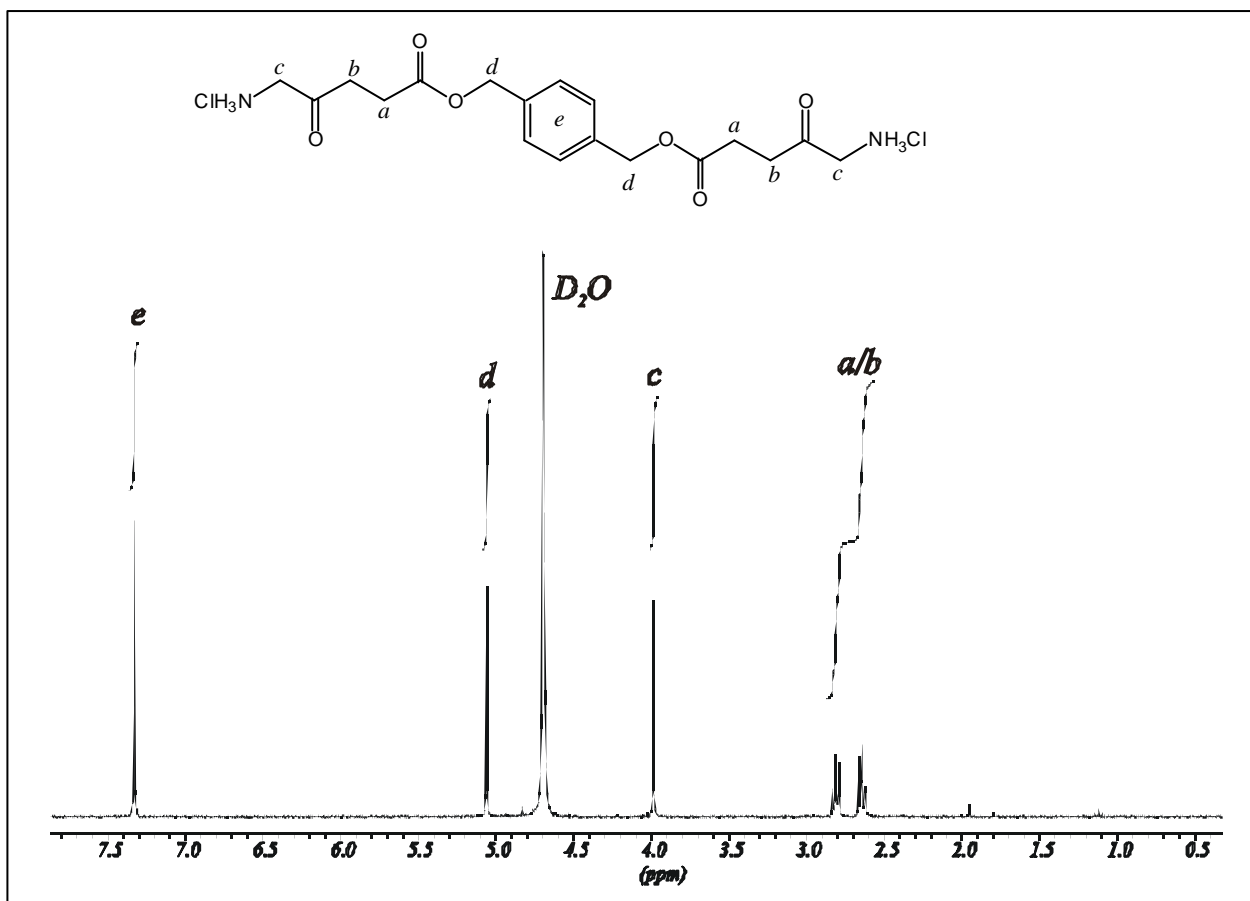


Abbildung 22:  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von Bis-ALA-1,4-dibenzyl diester-dihydrochlorid **21** in  $\text{D}_2\text{O}$

Aus den Abbildungen 23-25 sind die  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren des ALA-Hexylesters sowie des analogen Thiohexylesters bzw. des Nonafluorhexylesters ersichtlich. Die unterschiedliche chemische Umgebung (Schwefel bzw. Fluoratome) der der Esterbindung benachbarten Methylengruppen führt zu einer Veränderung der chemischen Verschiebung der Methylensignale. Im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum des ALA-Hexylesters (Abb. 23) kann den Methylengruppen a und b das entsprechende AA'BB'-System bei 2.67 und 2.83 ppm zugeordnet werden. Das Signal der der Esterbindung benachbarten Methylengruppen d (t,  $^3\text{J}(\text{H-H}) = 6.7 \text{ Hz}$ ) liegt bei 4.07 ppm. Die von der Esterbindung weiter entfernte Methylengruppe e weist eine chemische Verschiebung von 1.61 ppm auf. In Abbildung 24 ist das  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum des ALA-Thiohexylesters in  $\text{D}_2\text{O}$  dargestellt. Die geringere Elektronegativität des Schwefels im Vergleich zum Sauerstoff bewirkt im Gegensatz zum ALA-Hexylester eine Hochfeldverschiebung der benachbarten Methylengruppe e von ca. 2.9 ppm in den Bereich des AA'BB'-Systems.

Im Gegensatz hierzu sind die Signale der Methylengruppen d und e im Nonafluorhexylester (Abb. 25) aufgrund der stark elektronegativen Fluorsubstituenten tieffeldverschoben. Das Signal der Gruppe d ergibt ein Triplet bei 4.34 ppm ( $^3J(\text{H-H}) = 6.1$  Hz), wohingegen die Protonen der Gruppe e aufgrund der zusätzlichen Kopplung mit den benachbarten Fluoratomen eine Multipllettstruktur im Bereich von 2.50 ppm aufweisen, die von dem AA'BB'-System der Gruppen a und b überdeckt wird. Eine Analyse dieser Multipllettstruktur ist aus dem Spektrum der analogen N-BOC-geschützten Verbindung (Abb. 26) möglich. Bei dem Signal der Methylengruppe g im Bereich von 2.35-2.60 ppm liegt in erster Näherung eine Triplet-von-Triplett-Aufspaltung (neun Linien) vor. Dabei treten neben der großen Kopplung der Protonen der Gruppe g mit den beiden benachbarten Fluoratomen ( $^3J(\text{H-F}) = 18.3$  Hz) die Kopplung mit den benachbarten Methylenprotonen f ( $^3J(\text{H-H}) = 6.5$  Hz) auf. Zudem ist anhand der Feinstruktur (Schulterbildung) die zusätzliche Kopplung mit den Fluorsubstituenten des übernächsten Kohlenstoffatoms ( $^4J(\text{H-F}) = 1.5$  Hz) angedeutet.

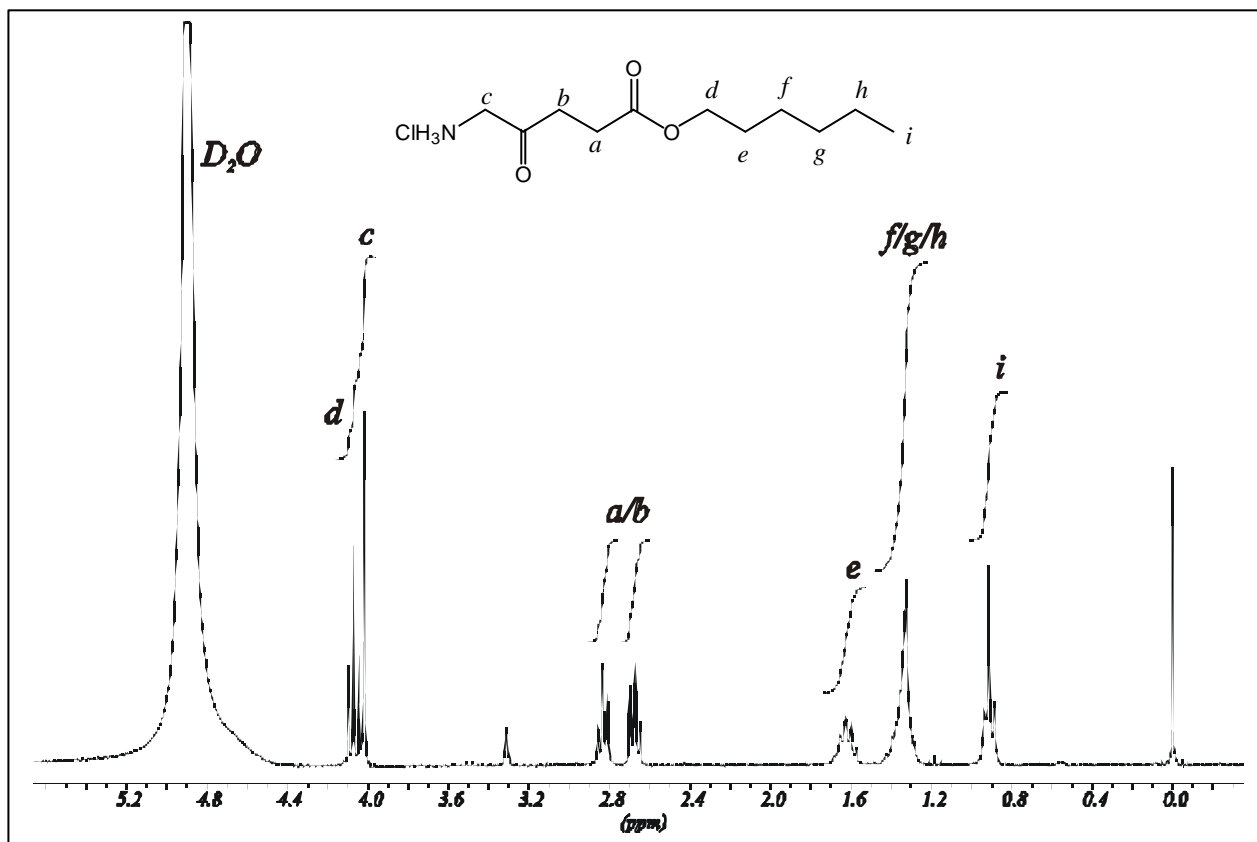
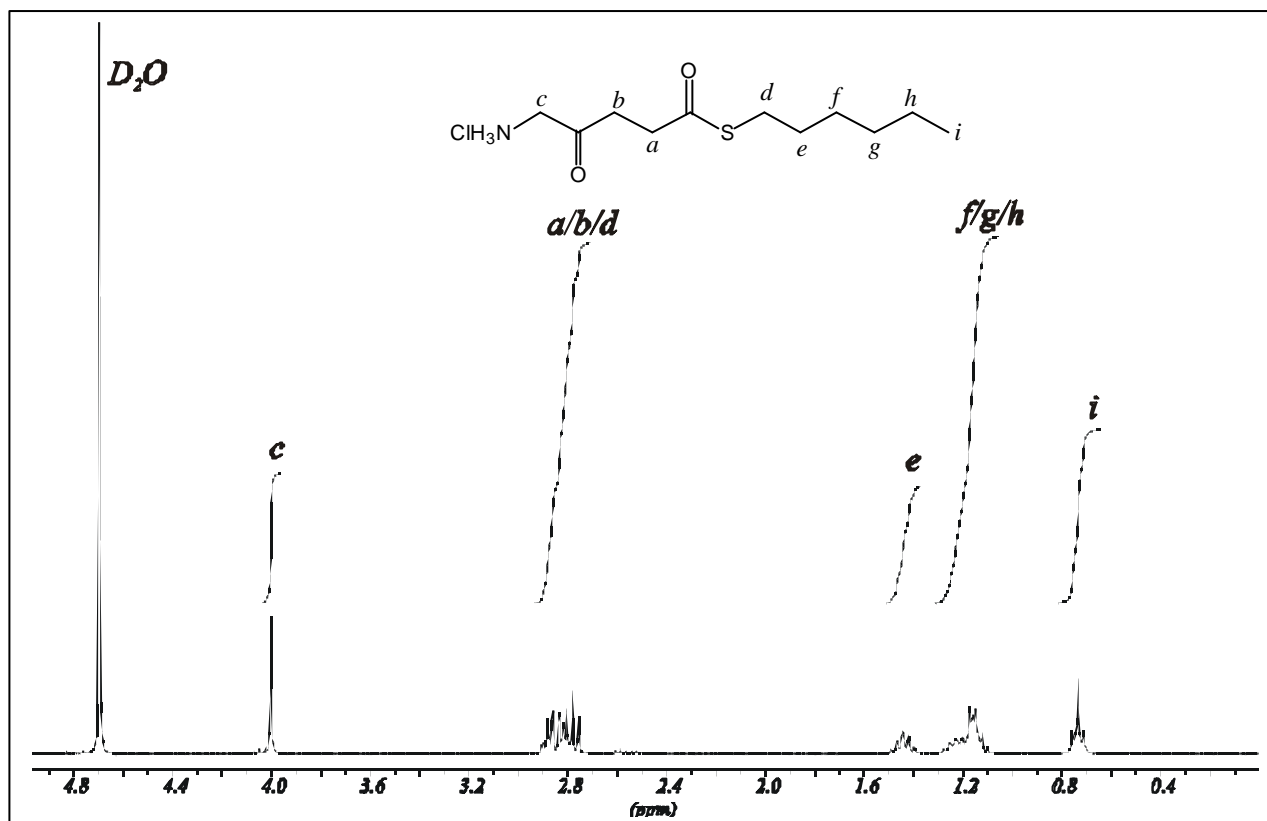
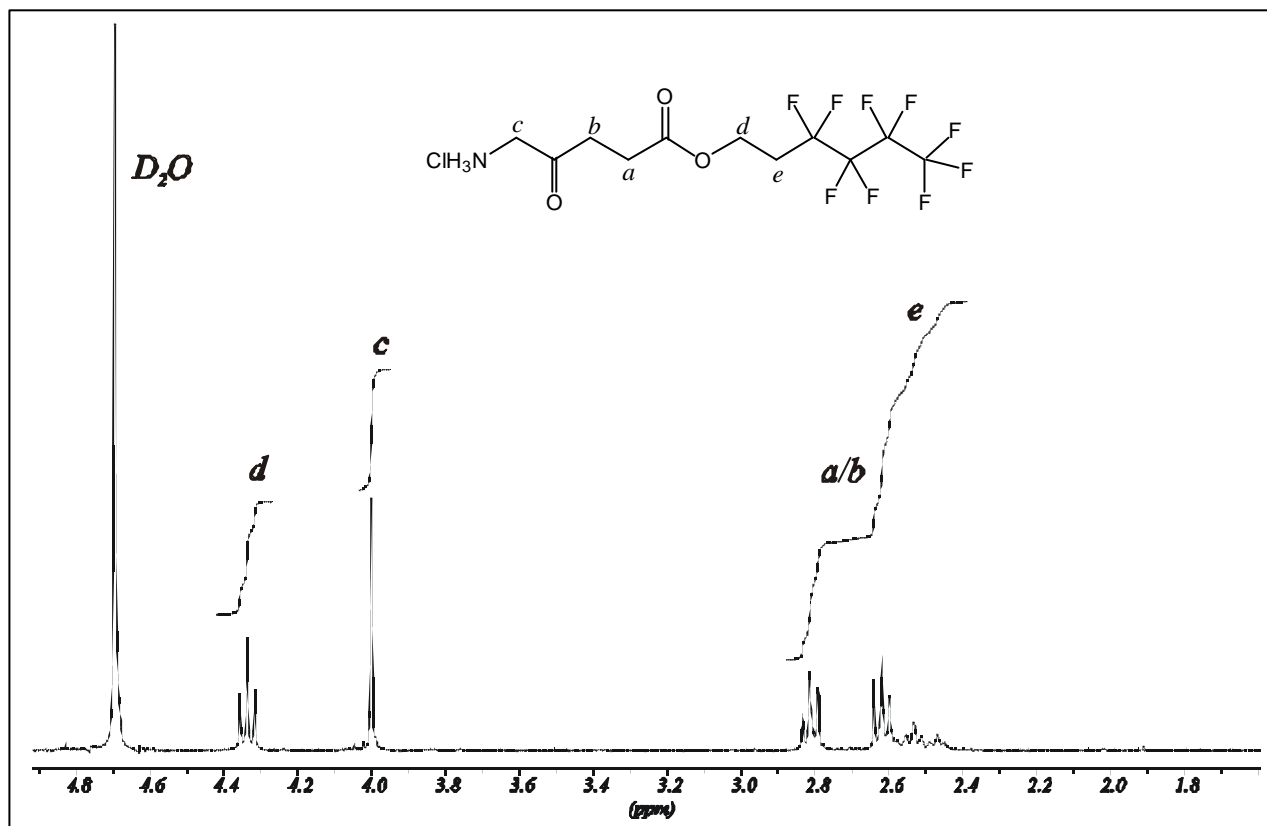


Abbildung 23:  $^1\text{H}$ NMR-Spektrum von ALA-hexylester-hydrochlorid **2** in  $\text{D}_2\text{O}$


 Abbildung 24:  $^1H$ -NMR-Spektrum von ALA-thiohexylester-hydrochlorid **21** in  $D_2O$ 

 Abbildung 25:  $^1H$ -NMR-Spektrum von ALA-1H,1H,2H,2H-nonafluorhexylester-hydrochlorid **19** in  $D_2O$

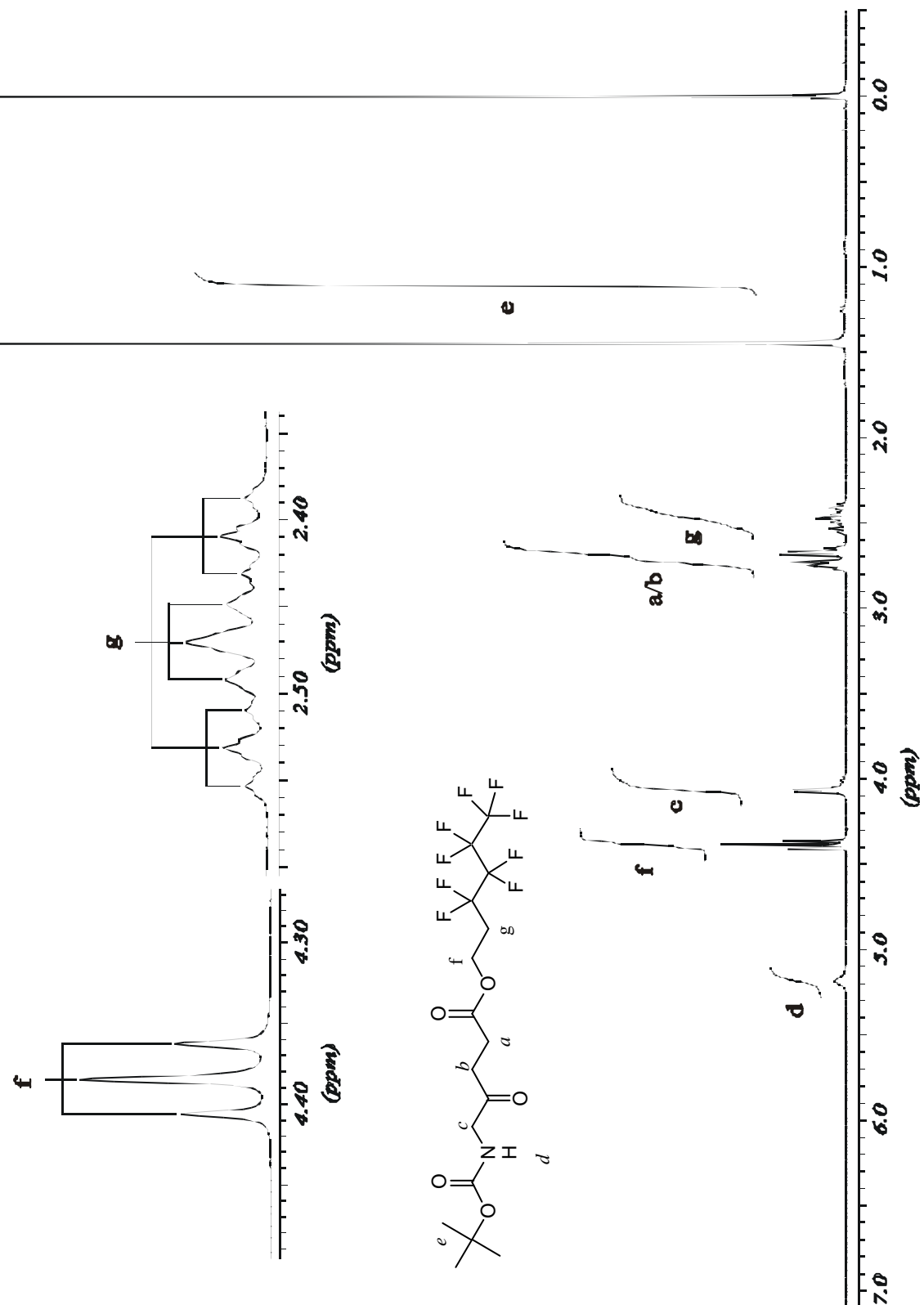


Abbildung 26:  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von BOC-ALA-1H,1H,2H,2H-nonafluorhexylester in  $\text{CDCl}_3$

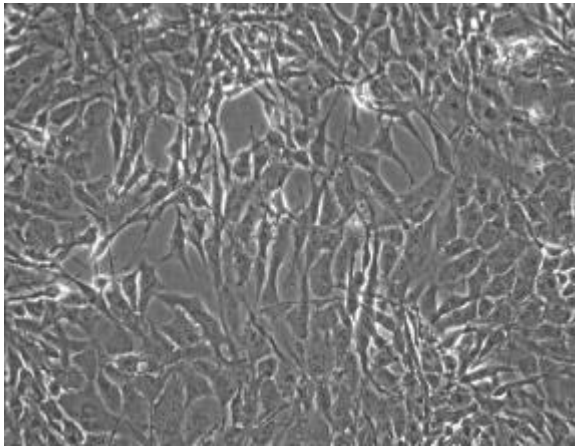


## 5. Material und Methoden

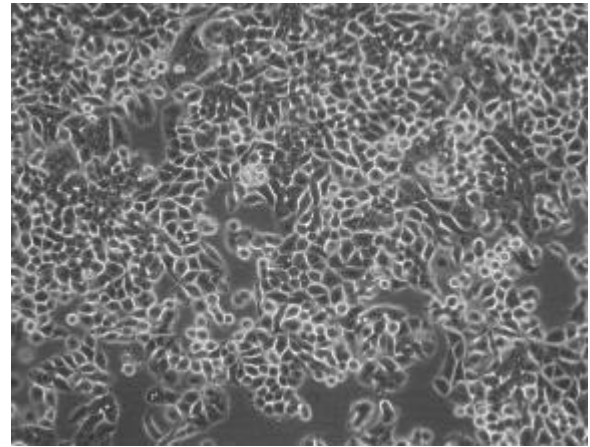
### 5.1 Grundlagen der Zellkultur

#### 5.1.1 *In vitro*-Modelle

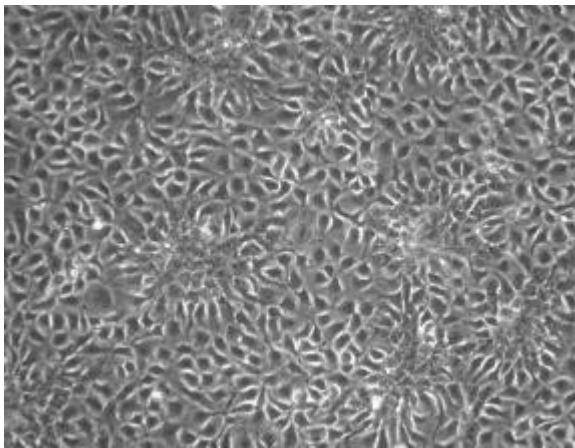
Alle zellbiologischen Experimente wurden an zwei verschiedenen *in vitro*-Modellen durchgeführt. Als Modell für die Harnblase diente die aus einem invasiven Urothelkarzinom stammende Karzinomzelllinie J82 mit niedrigem Differenzierungsgrad [G3]. Normale urotheliale Zellen wurden durch die Zelllinie UROTSA repräsentiert, welche aus normalem Urothel entnommen und durch Virus-Transformation immortalisiert wurde. Als *in vitro*-Modell des Gastrointestinaltrakts wurden wiederum zwei humane Zelllinien verwendet. Die mittelgradig differenzierte Zelllinie HT29 [G2] wurde aus dem kolorektalen Adenokarzinom einer 44-jährigen kaukasischen Patientin isoliert. Als Phänotyp des normalen Kolons diente die Kolonfibroblasten-Zelllinie CCD18, die aus dem Kolonresektat einer 2.5 Monate alten Mädchens etabliert wurde. Die verwendeten Zelllinien stammen von der Zellkulturbank American Type Tissue Collection (ATTC). Alle Zelllinien wachsen adhärent in Monolayerschichten, d.h. sie bilden einen mehr oder weniger dichten Zellrasen auf dem Boden der Kulturflasche (Abb.27). Der Vergleich von J82 und UROTSA ist der Vergleich von Tumor und normalem Urothel, wohingegen der Vergleich HT29 und CCD18 den Vergleich von Tumor und Fibroblast, d.h. Tumor und stromaler Unterlage, darstellt. Fibroblasten haben einen noch geringeren PPIX-Metabolismus als das normale Urothel. Die Virus-Transformation zur Immortalisierung der Urothel-Zelllinie UROTSA führt zu einem beschleunigten Zellwachstum, weshalb der Unterschied zum Normalurothel *in vivo* noch größer ist als in der Kultur. Somit sind für die PPIX-Akkumulation sowie daraus resultierenden Größen wie Akkumulationsindex und Phototoxizität im Kolonmodell HT29/CCD18 deutlich größere Unterschiede als im Urothelmodell J82/UROTSA zu erwarten.



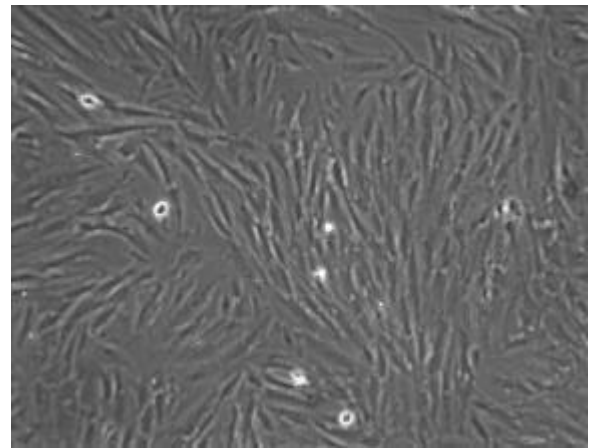
J82



HT 29



UROTSA



CCD18

*Abbildung 27: Phasenkontrastaufnahmen der verwendeten Zelllinien*

### 5.1.2 Methoden der Kultivierung<sup>[64, 65]</sup>

Die Zellen wurden in Polystyrolflaschen der Größe T75 (75 cm<sup>2</sup> Wachstumsfläche) kultiviert. Die verwendeten Lösungen wurden vor Gebrauch auf 37°C thermostatisiert. Alle zwei Tage erfolgte ein Wechsel der Medien (J82: Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI), 5% FKS (fötales Kälberserum); HT29: Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM), 5% FKS; UROTSA; RPMI, 5% FKS; CCD18: Minimum Essential Medium (MEM), 5% FKS). Jedes Medium war zusätzlich mit 1% Natriumpyruvat und 1% L-Glutamin versetzt. FKS enthält essenzielle Wachstumsfaktoren, die zugesetzten Verbindungen sind für den Stoffwechsel erforderlich. Es wurden weder ein Antibioti-

kum (Abwehr von eingeschleppten Bakterien oder Keimen) noch ein Zusatz von Phenolrot (Indikator für das Alter des Mediums) verwendet, da diese bei den Fluoreszenzuntersuchungen stören. Die Kulturflaschen wurden in einem Brutschrank unter sterilen Bedingungen aufbewahrt (wasserdampfgesättigte Atmosphäre, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Bei Erreichen subkonfluenten Wachstums wurden die Zellen passagiert. Hierzu wurde das Medium abgesaugt, die Zellmonolayerschicht mit 10 ml phosphatgepufferter Salzlösung (PBS, pH=7.6, 37°C) gewaschen und jede T75-Flasche mit ca. 1 ml Trypsinlösung (0.1% Trypsin, 0.04% EDTA in isotonischer Kochsalzlösung) versetzt. Nach ca. 6 Minuten wurde die vollständige Ablösung der Zellen unter dem Phasenkontrastmikroskop kontrolliert. Die Zellen wurden in 10 ml FKS-haltigem Medium (Abstoppen der Trypsinwirkung) resuspendiert. Anschließend wurden sie in 50 ml-Falcon-Tubes überführt und abzentrifugiert (Rotor 30 cm, 1200 Umdrehungen, 5 Minuten). Der entstandene Bodensatz (Pellet) wurde in 10 ml Medium resuspendiert. Dann wurden die Zellen mit einer Pipette vereinzelt. Nach der Bestimmung der Zellkonzentration in einer Neubauer-Zählkammer unter dem Phasenkontrastmikroskop erfolgte die Aussaat mit der gewünschten Zellzahl in den entsprechenden Kulturgefäßen. Alle Messungen wurden im postkonfluenten Wachstumszustand durchgeführt, welcher durch Aussaat nach folgenden Bedingungen erreicht wurde:

Zelllinie	postkonfluent	Wachstumsdauer
J82	$6 \times 10^3 / \text{cm}^2$	8 d
HT29	$5 \times 10^4 / \text{cm}^2$	7 d
URO TSA	$6 \times 10^3 / \text{cm}^2$	10 d
CCD18	$1 \times 10^4 / \text{cm}^2$	8 d

*Tabelle 1: Wachstumsdichten der verwendeten Zelllinien*

## 5.2 Absorptions- und Emissionsspektrum von PPIX

Das zu vermessende PPIX besitzt in Abhängigkeit vom Lösungsmittel neben vier kleinen Absorptionsbanden zwischen 500-630 nm (Q-Banden) ein Absorptionsmaximum (Soretbande) bei ca. 400 nm. Anregung bei 398 nm ergibt ein Emissionsmaximum bei

604 nm in einer 1:1-Mischung aus Methanol und einmolarer Perchlorsäure (Abb. 28). Die Messung von Fluoreszenzspektren ist in viel größerem Maße von der Wechselwirkung mit den umgebenden Lösungsmittelmolekülen abhängig als die Messung von Absorptionsspektren.

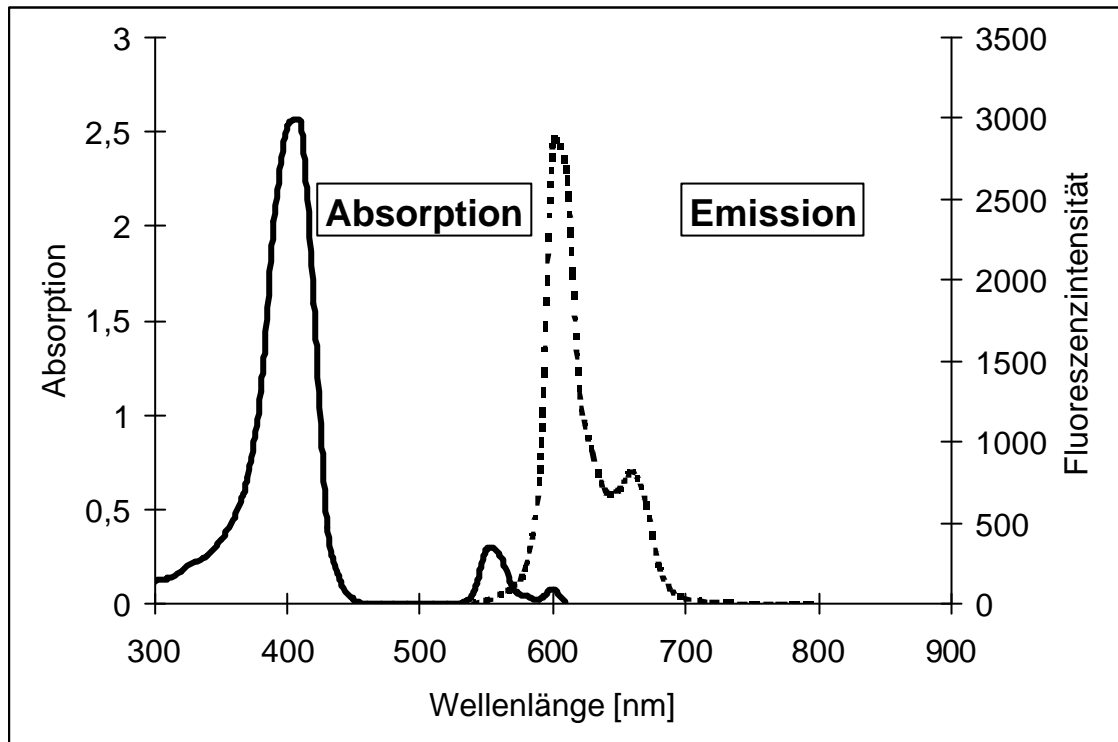


Abbildung 28: Absorptions- und Emissionsspektrum von PPIX (MeOH/1m HClO<sub>4</sub>=1:1)

## 5.3 Durchflussszytometrie

### 5.3.1 Prinzip

Bei durchflussszytometrischen Messungen (FACS: fluorescence activated cell scanning) wird eine Zellsuspension über eine Kanüle angesaugt, in einem konstanten Fluss an einem Laserstrahl vorbeigeführt und die dabei induzierte Fluoreszenz detektiert, sowie das Streulichtverhalten der Zelle gemessen<sup>[66]</sup>. Als Trägerflüssigkeit dient hierbei eine isotonische Kochsalzlösung mit Zusatz eines Desinfektionsmittels (Hüllflüs-

sigkeit). Der Geschwindigkeitsgradient in der Düse bewirkt, dass die Zellen einzeln nacheinander den Laserstrahl passieren, wobei Raten von mehreren 1000 Events/s möglich sind. Im verwendeten Durchflusszytometer (FACSCalibur) dient ein Argon-Ionen-Laser ( $\lambda=488$  nm, 15 mW) zur Anregung.

### 5.3.2 Lichtdetektion<sup>[67]</sup>

Beim Passieren des Laserstrahls streut jedes Teilchen einen Teil des Anregungslichts. Dieses Streulicht wird in Richtung des Laserstrahls ( $1.5-10^\circ$ , Vorwärtsstreulicht, forward scatter light, FSC,  $488 \pm 5$  nm) und senkrecht hierzu ( $90^\circ$ , Seitwärtsstreulicht, side scatter light, SSC,  $488 \pm 5$  nm) von einem Festkörpersiliziumdetektor (für FSC) bzw. von einem Photomultiplier (für SSC) erfasst. Das eigentliche Fluoreszenzsignal wird ebenfalls in  $90^\circ$ -Richtung detektiert. Durch geeignete dichroitische Spiegel wird dieses vom SSC abgetrennt. Eine weitere Aufspaltung erfolgt über zusätzliche Filter und dichroitische Strahlenteiler. Das Signal wird dann an vier Fluoreszenzkanäle (FL) geleitet. Jeder dieser Kanäle ist mit einem Photomultiplier gekoppelt, dessen Verstärkerspannung an die jeweilige Signalintensität angepasst werden kann (zum Aufbau vgl. Abb. 29). Alle gemessenen Parameter (FSC, SSC, FL1-4) werden softwaremäßig weiterverarbeitet.

Fluoreszenz 1 (FL1):  $530 \pm 15$  nm Bandpass

Fluoreszenz 2 (FL2):  $585 \pm 21$  nm Bandpass

Fluoreszenz 3 (FL3): 670 nm Langpass

Fluoreszenz 4 (FL4):  $661 \text{ nm} \pm 8$  nm Bandpass

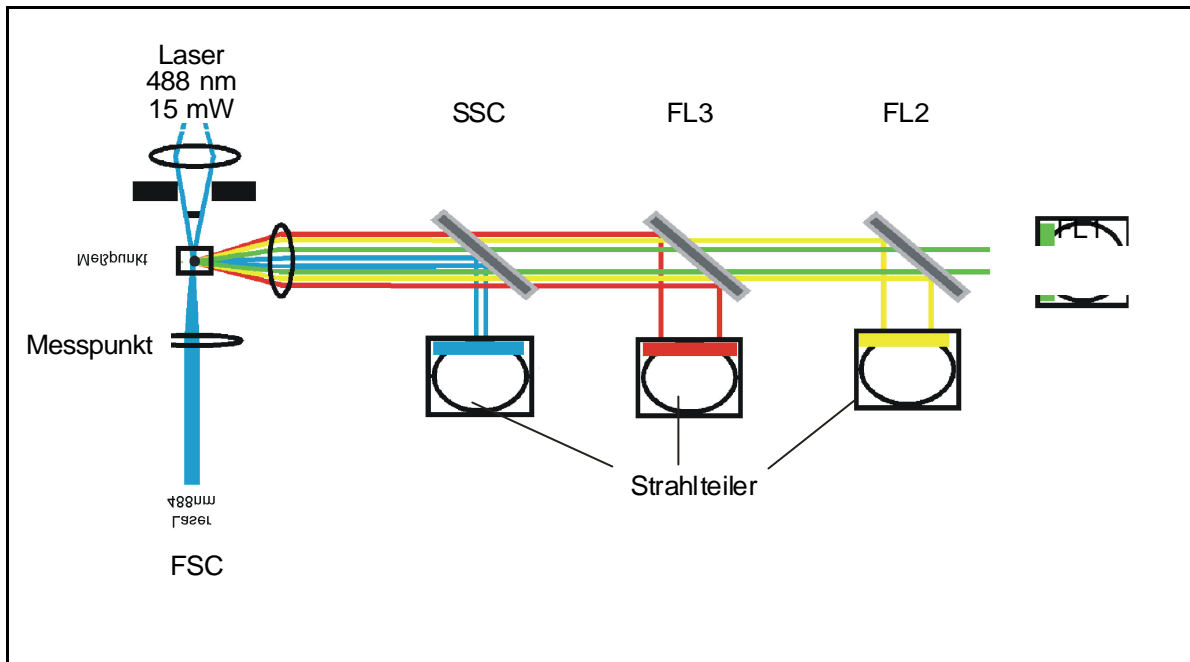


Abbildung 29: Schematischer Strahlengang eines Durchflusszytometers

### 5.3.3 FACS-Messungen

#### 5.3.3.1 Probenvorbereitung

Generell wurden alle Arbeitsschritte unter Lichtausschluss und absolut sterilen Bedingungen durchgeführt. Nach Erreichen postkonfluenten Wachstums wurden die Zellen nach Spülen mit PBS (Abtragen möglicher toter Zellen) mit den Inkubationslösungen im FKS-freien Medium versetzt. Nach Ablauf der gewünschten Inkubationszeit wurden die Zellen im Dunkeln abtrypsiniert, wobei durch zügiges Arbeiten eine Ausschleusung des gebildeten PPIX in das nun FKS-haltige Medium verhindert wurde. Nach der Zentrifugation wurde das Pellet in PBS resuspendiert (ca. 500 000 Zellen/ml). Diese Suspension wurde bis zur Messung im Dunkeln auf Eis aufbewahrt. Anschließend wurden die Proben möglichst schnell im Dunkeln vermessen.

#### 5.3.3.2 Geräteparameter

Bei jeder Messung wurden  $2 \times 10^4$  Events erfasst. Zur Erhöhung der Messgenauigkeit wurden bis zu 2000 Events/s zugelassen. Die Durchtrittsgeschwindigkeit der Suspension durch den Laserstrahl kann am Gerät in drei Stufen (low: 12  $\mu$ l, medium: 35  $\mu$ l,

high: 60  $\mu\text{l}/\text{min}$ ) variiert werden. Die Zellkonzentration der Suspension sollte ca.  $5 \times 10^5/\text{ml}$  betragen. Folgende Einstellung der Geräteparameter wurde vorgenommen:

Kanal	Verstärkung	Modus
FSC	E-01	logarithmisch
SSC	200 V	logarithmisch
FL1	-	-
FL2	-	-
FL3	650 V	logarithmisch
FL4	-	-
Schwellenwert	FSC = 500	-

*Tabelle 2: Geräteparameter Durchflusszytometer*

#### 5.3.3.3 Auswertung der FACS-Daten

Die Hauptinformationen der durchflusszytometrischen Messungen sind im so genannten Dotplot enthalten, bei dem Vorwärts- gegen Seitwärtsstreulicht (FSC/SSC) aufgetragen wird (siehe Abb. 30). Durch diese Darstellungsweise wird die gemessene Probe bezüglich ihres Streulichtverhaltens charakterisiert, wobei das FSC-Signal Auskunft über die Zellgröße und das SSC-Signal über die Granularität der Zellen gibt. So lässt sich die Zellpopulation als Anhäufung von Ereignissen erkennen, wobei der Schweif links unten im Diagramm keinen Zellen, sondern kleineren Bestandteilen (Organellen von toten Zellen etc.) entspricht und zur Auswertung nicht herangezogen wird. Mittels der Software WinMdi wird eine Region um die Zellpopulation gelegt. Nur die innerhalb dieses Areals liegenden Events werden berücksichtigt. Anschließend wird die mittlere Fluoreszenzintensität mit Hilfe eines Histogramms (Auftragung der Zahl der Events gegen die Fluoreszenzintensität) bestimmt (Abb. 30). Zur Berücksichtigung der Autofluoreszenz der Zellen wurden separat entsprechende Proben unbehandelter Zellen gemessen und die Messwerte zum Mittelwert dieser Nullwerte ins Verhältnis gesetzt.

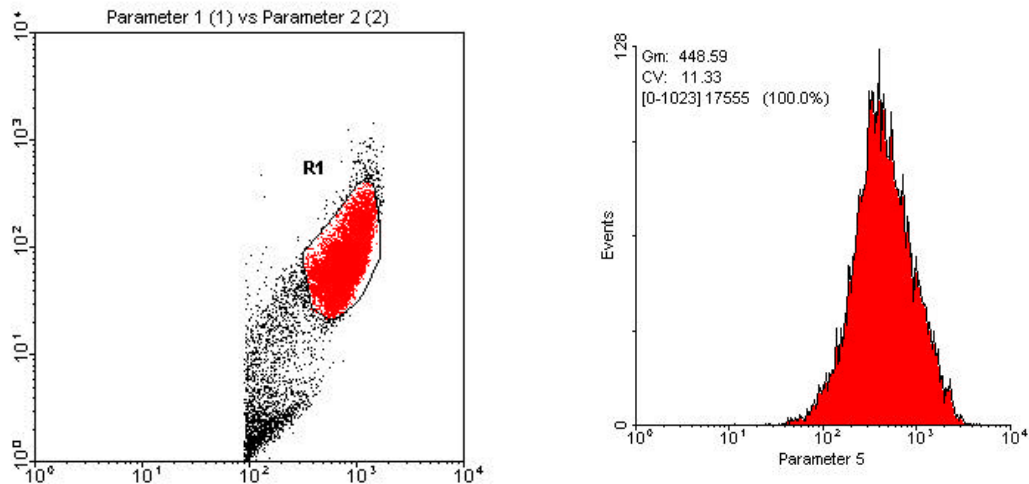


Abbildung 30: Dotplot (FSC/SSC) von HT29 mit dazugehörigem FL3-Histogramm

Pro Zelllinie wurden jeweils drei unabhängige Messungen (unterschiedliche Passagen) durchgeführt und der Mittelwert sowie die Standardabweichung der Messungen ermittelt. Dabei wurden die gemessenen Fluoreszenzintensitäten zur zelllinienspezifischen Autofluoreszenz (unbehandelte Zellprobe) ins Verhältnis gesetzt ( $FLOW = I/I_0$ ). Weiterhin wurde der PPIX-Gehalt pro mg Protein mittels entsprechender Kalibrierungskurven<sup>[68]</sup> berechnet. Bei den zeitabhängigen Messungen wurde durch die Messwerte eine Michaelis-Menten-Fit-Kurve (Sigma-Plot 2.0) gelegt, da der PPIX-Metabolismus der Zellen durch folgende Michaelis-Menten-Kinetik beschrieben werden kann:

$$V = \frac{c \cdot V_{\max}}{K_M + c}$$

V: Geschwindigkeit der Enzymreaktion

c: intrazelluläre Konzentration nach Inkubationszeit t

$K_M$ : Michaelis-Konstante (Konzentration zum Erreichen halbmaximaler Sättigung)

$V_{\max}$ : Maximalgeschwindigkeit für Substratsättigung



Folgende Auftragungen wurden im Rahmen der FACS-Messungen dargestellt:

Durchflusszytometrisches Screening (6.1):

PPIX [ng/mg (Protein)] = f (Substrat)

Zeitabhängiges Screening (siehe 6.3):

PPIX [ng/mg (Protein)] = f (Inkubationszeit)

Tumorselektive PPIX-Akkumulation (siehe 6.4):

Akkumulationsindex =  $\frac{\text{PPIX (Karzinomzelllinie)}}{\text{PPIX (Normalgewebe)}}$

## 5.4 Der MTT-Test

Bei MTT-Tests (Abb. 31) dient die Mitochondrienaktivität als Parameter der Zellviabilität<sup>[69]</sup>. Die Aussaat der Zellen wird in 96-Well-Platten durchgeführt. Bei Erreichen entsprechender Wachstumsdichte erfolgte die Inkubation mit den Esterlösungen (0.12 mmol/l, 3 h, FKS-freies Medium). Danach wurde mit PBS gespült und das entsprechende Medium zugegeben. Nach 24-stündigem Wachstum erfolgte die Inkubation (4 h, 37°C) mit dem Farbstoff MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromid). MTT wird in den Mitochondrien von einer Dehydrogenase<sup>[70]</sup> zu einem Formazanderivat umgesetzt (Farbumschlag von gelb nach violett).

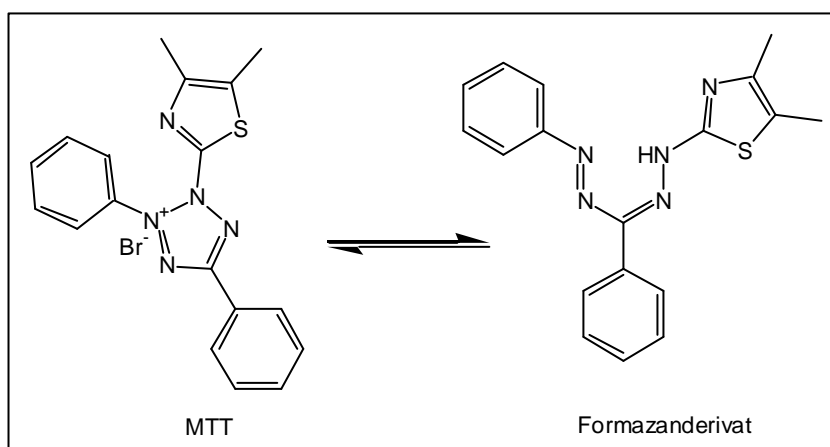


Abbildung 31: MTT-Test

Durch Zugabe von Natriumdodecylsulfat (SDS) werden die Zellen aufgelöst und es wird eine homogene, gefärbte Lösung erzeugt. Im Anschluss erfolgt die Absorptionsmessung an einem Mikrotiterplatten-Photometer (540 nm). Im Vergleich zu einer unbehandelten Probe kann so der Vitalitätsgrad bestimmt werden.

$$A = \log(I_0/I) = \epsilon dc$$

A: Absorption,  $I_0$ : Intensität des einfallenden Lichtstrahls, I: gemessene Intensität,  $\epsilon$ : molarer Extinktionskoeffizient, d: Schichtdicke, c: Konzentration

## 5.5 Quantifizierung der Phototoxizität

Die phototoxischen Eigenschaften eines Photosensibilisators werden durch die Quantenausbeute und seine intrazelluläre Lokalisation sowie in besonderem Maße durch die zellulär akkumulierte Menge und die applizierte Strahlungsdosis bestimmt. Die Zellen wurden mit äquimolaren ALA-Esterlösungen inkubiert. Dieses Vorgehen nutzt die präferenzielle PPIX-Akkumulation aus und entspricht der *in vivo*-Situation bei vergleichbarer klinischer Applikation.

### 5.5.1 Durchführung

Um die Effektivität von PPIX als Photosensibilisator quantifizieren zu können, wurden Zellen (Kolon: HT29/CCD18, Urothel: J82/UROTSA) in der gewünschten Wachstumsdichte in 6-Well-Platten kultiviert und 3 Stunden mit ALA- und ALA-Esterlösungen (0,12 mmol/l) im Dunkeln mit Medium ohne FKS inkubiert. Die Zellen wurden mit frischem Medium ohne FKS versehen und anschließend mit verschiedenen Energiedosen bestrahlt. Zur Anwendung kam eine inkohärente Bestrahlungsquelle, wie sie auch in der Klinik Verwendung findet (Xenon-Kaltlichtprojektor). Durch den Einsatz geeigneter Filter wurde nur der Bereich  $\lambda=590-700$  nm für die Bestrahlung

zugelassen und Energiedosen von 0-30 J/cm<sup>2</sup> bei konstant 40 mW/cm<sup>2</sup> appliziert. Anschließend wurde mittels Klonogenitätstests die Zellvitalität bestimmt.

### 5.5.2 Klonogenitätstest

Sofort nach der Bestrahlung wurden die Zellen mit PBS gewaschen, mit frischem, FKS-haltigem Medium versetzt und 24 Stunden weiterkultiviert. Die Zellen wurden anschließend in 96-Wells ausgesät, unter Standardbedingungen einen Tag weiterkultiviert und danach einem MTT-Test unterzogen. Als Ergebnis erhält man den Vitalitätsgrad (im Vergleich zu bestrahlter nichtinkubierter Probe) in Abhängigkeit von der applizierten Strahlungsdosis. Der Klonogenitätsnachweis fordert als Vitalitätskriterium zusätzlich zum reinen Überleben der PDT die Fähigkeit der Zellen, nach der Passage erneut anzuwachsen und zu proliferieren. Aufgrund der härteren Zellvitalitätskriterien ersetzt der Klonogenitätsnachweis in der aktuellen Fachliteratur<sup>[71]</sup> zunehmend die manuelle Zählmethode.

Bei der Auswertung wurde jeweils die prozentuale Zellvitalität als Funktion der applizierten Bestrahlungsdosis aufgetragen. In die erhaltenen Werte konnte eine vierparametrische Funktion eingepasst werden (Origin):

$$y=(a-d)/\{1+(x/c)^b\}+d$$

x: Bestrahlungsdosis [J/cm<sup>2</sup>]

y: Zellvitalität A

a, b, c, d: freie Parameter des Systems

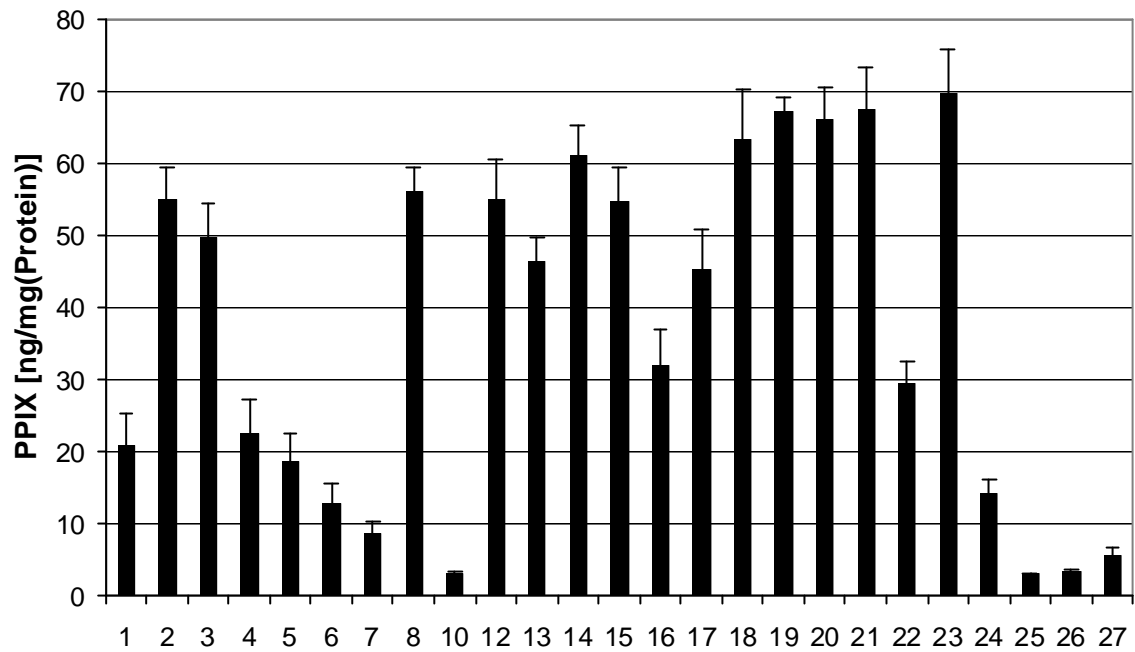
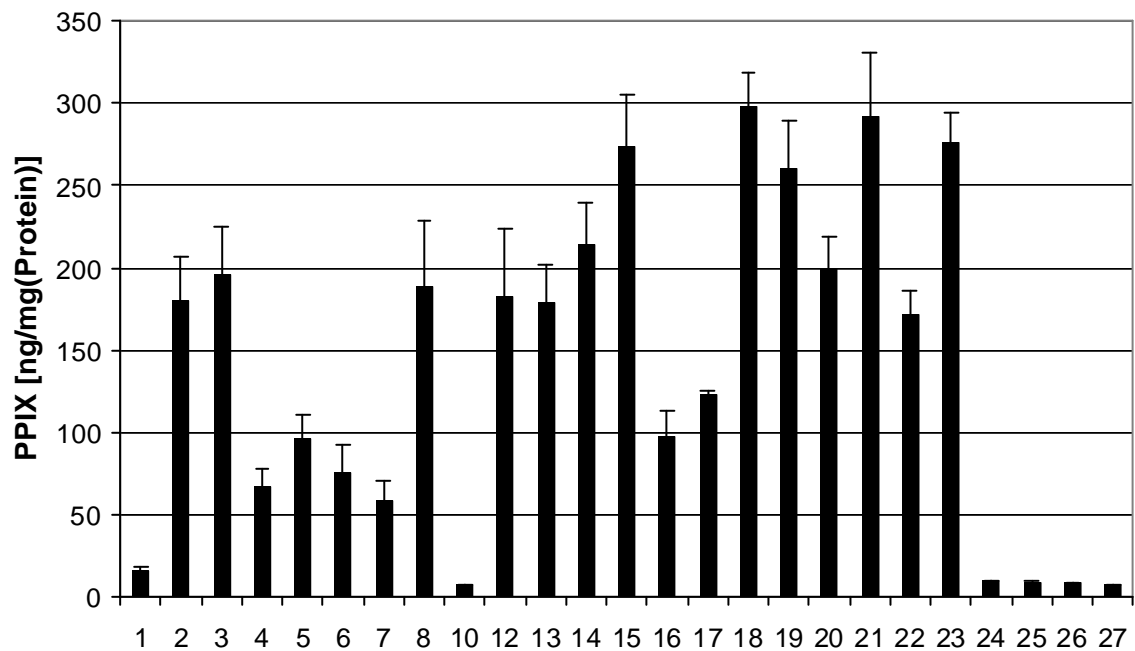
Aus den berechneten Dosis-Wirkungs-Kurven konnte die substanz- und zelllinienspezifische Bestrahlungsdosis LD<sub>50</sub> bestimmt werden, bei der die Zellvitalität auf 50% abnimmt. Die entsprechenden LD<sub>50</sub>-Verhältnisse zwischen Tumorzellen und Normalgewebszellen wurden berechnet.

## 6 Auswertung der Ergebnisse

### 6.1 Durchflusszytometrisches Screening

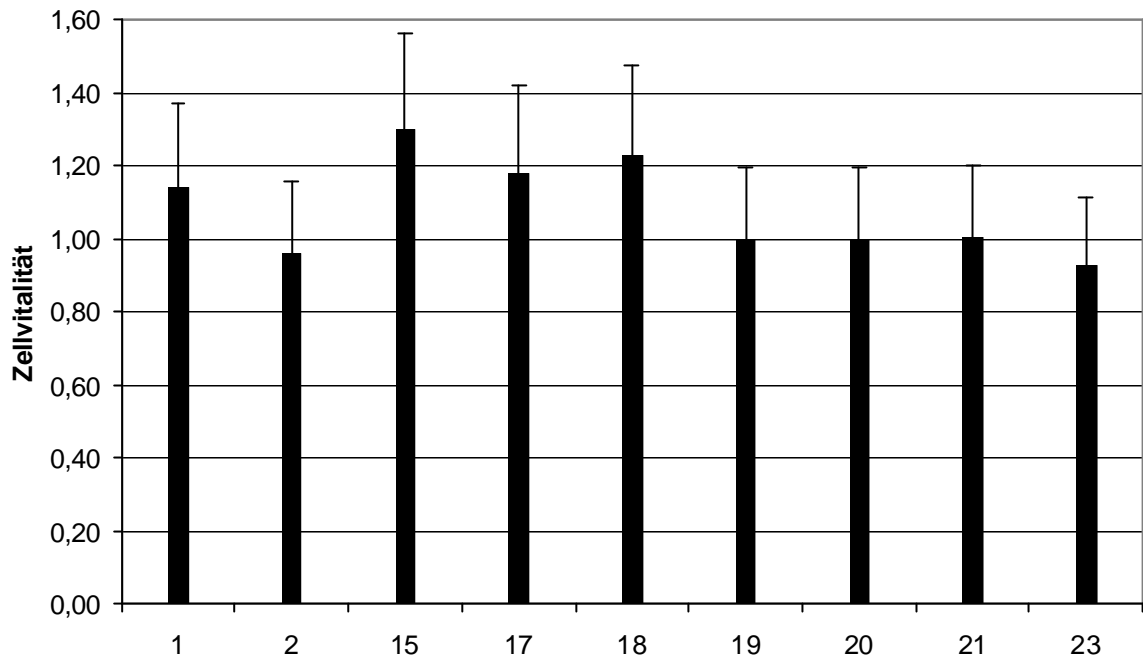
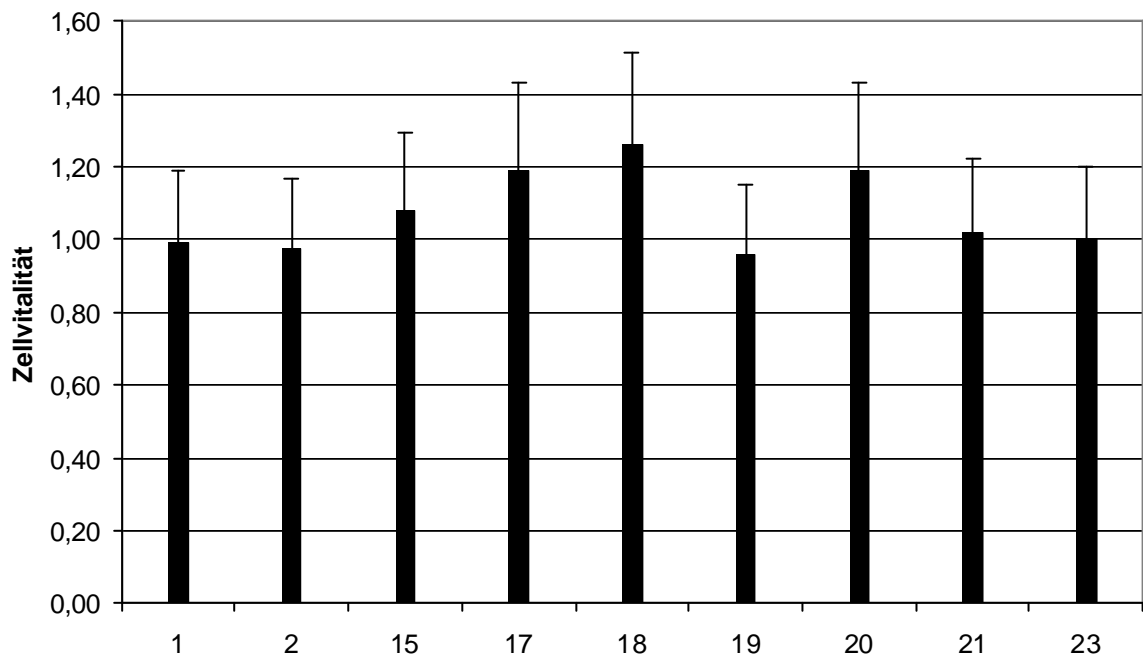
Die synthetisierten ALA-Ester wurden durchflusszytometrisch auf die durch sie induzierte PPIX-Akkumulation hin untersucht. Ziel war es, besonders effektive Substanzen – höhere PPIX-Anreicherung als ALA-Hexylester – herauszuscannen und somit potenzielle Verbindungen für die PDD und PDT zu erkennen. Neben der humanen Adenokarzinom-Zelllinie HT29 und der humanen Urothelkarzinom-Zelllinie J82 wurden als Vertreter des gesunden menschlichen Darm- und Harnblasengewebes die Fibroblasten-Zelllinie CCD18 und die Urothel-Zelllinie UROTSA untersucht. Die Zellen wurden mit Esterlösungen sowie mit einer äquimolaren ALA-Lösung (0.12 mmol/l, 3 h) in FKS-freiem Medium im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde wie unter 5.3.3 beschrieben aufgearbeitet und die Fluoreszenzintensität der Proben gemessen. Unter Berücksichtigung der zellspezifischen Autofluoreszenzen ( $I_0$ ) wurden die relativen Fluoreszenzintensitäten  $FLOW = I/I_0$  berechnet. Mittels Extraktion bestimmter Kalibrierungskurven ließ sich der PPIX-Gehalt in ng/mg Protein berechnen. So konnten die Fluoreszenzwerte auf die der Probe entsprechenden Masse Protein normiert werden. Da generell die Fehler bei zellbiologischen Untersuchungen relativ hoch liegen (10-30%), wurden alle Messungen dreimal wiederholt und der Mittelwert sowie die Standardabweichung berechnet. Neben den Standardverbindungen ALA **1**, ALA-Hexylester **2** und ALA-Benzylester **3** wurde die PPIX-Akkumulation der ALA-Derivative **4-27** in J82 (Abb. 32) und in HT29 (Abb. 33) untersucht. Analog zu den Ergebnissen der Diplomarbeit<sup>[72]</sup> induzieren der Hexylester **2** und Benzylester **3** in etwa dieselbe PPIX-Produktion. Eine Derivatisierung am Stickstoff der 5-Aminolävulinsäure führt zu einer drastischen Abnahme der PPIX-Induktion. Sowohl BOC-ALA **10** und der Phthal-geschützte Diaminopropylester **26** sowie das ALA-Methylesterdiaminobenzoessäureamid **27** ergeben extrem geringe PPIX-Niveaus, was durch einen verringerten Transport in die Zelle bzw. durch eine nur unzureichende Abspaltung der BOC- und Phthal-Schutzgruppe sowie des Benzoessäureamidrests aufgrund eines Mangels an unspezifischen intrazellulären Amidasen bedingt sein könnte.

Der ungeschützte Diaminopropylester **25** induziert ebenso sehr geringe PPIX-Werte in beiden Zelllinien. Ein Grund hierfür könnte in der durch die drei Hydrochloridreste verringerten Lipophilie der Verbindung liegen. Des Weiteren generieren der ALA-Phenylester **16** sowie die 5-Aminolävulinsäureoxaalkylester **4-7** deutlich geringere PPIX-Level in beiden Karzinomzelllinien als der ALA-Hexylester **2**. Die substituierten 5-Aminolävulinsäurebenzylester **8** und **12-14** erzeugen in beiden Zelllinien dem ALA-Hexylester äquivalente PPIX-Konzentrationen. Der ALA-p-Nitrobenzylester **15** konnte in HT29 eine signifikante Steigerung der PPIX-Akkumulation im Vergleich zum Hexylester erreichen. Analog zu den entsprechenden unsubstituierten ALA-Alkylestern konnte bei den fluorierten ALA-Alkylestern eine maximale PPIX-Akkumulation der Pentyl- und Hexylverbindungen beobachtet werden. Sowohl der 5-Aminolävulinsäure-1H,1H,5H-octafluorpentylester **18** als auch der 5-Aminolävulinsäure-1H,1H,2H,2H-nonafluorhexylester **19** induzierten eine drastische Steigerung der PPIX-Akkumulation im Vergleich zum Hexylester. Die ALA-Diester und der ALA-Tetraester erzeugten deutlich unterschiedliche PPIX-Level. Der ALA-Tetraester **24** ergab eine deutlich geringere PPIX-Anreicherung als ALA **1**. Möglicherweise ist hierbei die Diffusion durch die Zellmembran und die anschließende enzymatische Hydrolyse aufgrund des größeren sterischen Anspruchs des mit vier ALA-Ketten verknüpften Pentaerythritylrests erschwert. Im Gegensatz hierzu generierte der einfache lineare Glykoldiester **22** eine in beiden Zelllinien deutlich höhere PPIX-Produktion als ALA. Von besonderem Interesse sind die neuen und bisher noch nicht patentierten Verbindungen **18**, **19**, **21** und **23**. Die fluorierten Alkylester **18** und **19**, der ALA-Thiohexylester **21** sowie der Bis-ALA-1,4-dibenzylester **23** führten in beiden Zelllinien zu einer signifikanten Steigerung der PPIX-Akkumulation um bis zu 62% in HT29 und bis zu 27% in J82 im Vergleich zum Hexylester.

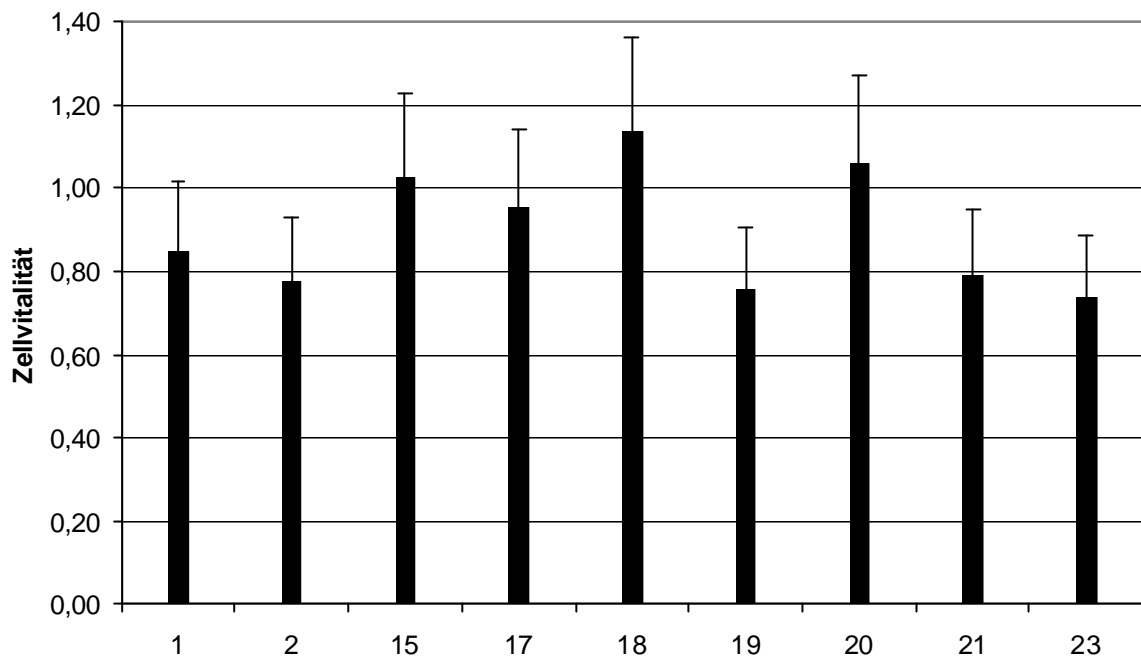
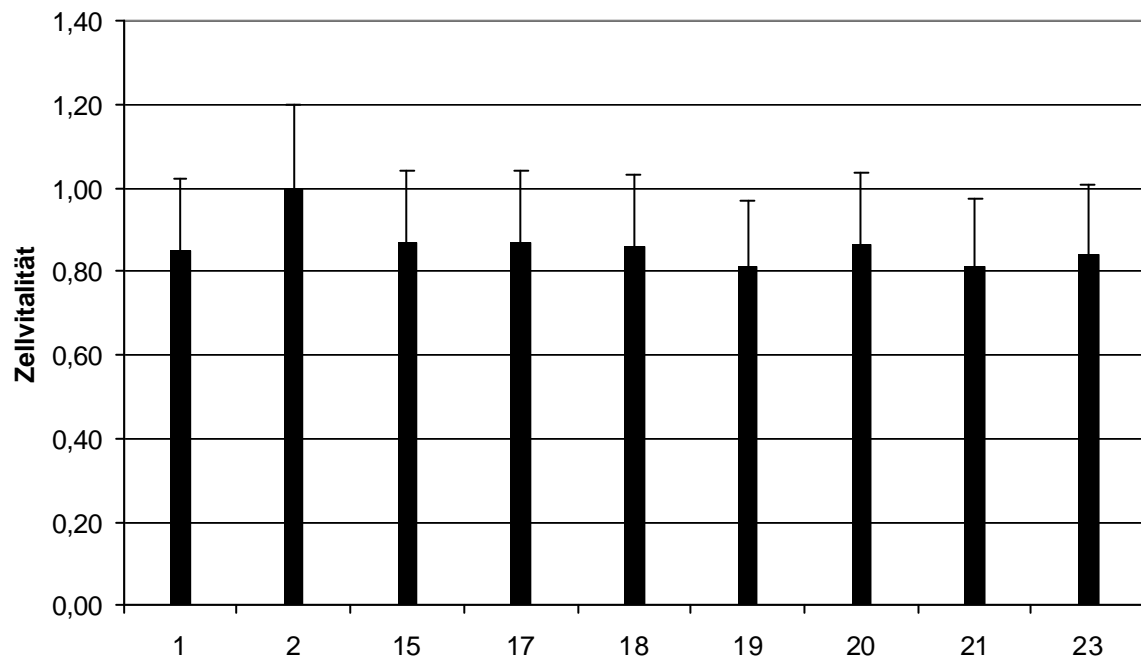
*Abbildung 32: PPIX-Akkumulation in J82**Abbildung 33: PPIX-Akkumulation in HT29*

## 6.2 Dunkeltoxizitätstest

Die Aussaat der Zellen wurde in 96-Well-Platten durchgeführt. Beim Erreichen postkonfluenten Wachstums erfolgte die Inkubation mit den Esterlösungen (0.12 mmol/l, 3 h, FKS-freies Medium). Danach wurde mit PBS gespült und es wurde nach Zugabe der entsprechenden Medien 24-stündiges Wachstum ermöglicht. Anschließend wurde mit dem Farbstoff MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid) inkubiert (4 h, 37°C). Durch Zugabe von Natriumdodecylsulfat (SDS) wurden die Zellen aufgelöst und es wurde eine homogene, violett gefärbte Lösung erhalten. Im Anschluss erfolgte die Absorptionsmessung an einem Mikrotiterplatten-Photometer (540 nm). Im Vergleich zu einer unbehandelten Probe kann so der Vitalitätsgrad bestimmt werden. Die MTT-Tests wurden pro Zelllinie dreimal wiederholt und der Mittelwert sowie die Standardabweichung ermittelt. Neben ALA **1** und ALA-Hexylester **2** wurden der ALA-Nitrobenzylester **15**, die fluorierten Alkylester **17-20** sowie der ALA-Thiohexylester **21** und ALA-Dibenzylester **23** auf ihre Dunkeltoxizität getestet. Wie aus den Abbildungen 34-37 ersichtlich ist, zeigte keine der untersuchten Substanzen eine signifikante Dunkeltoxizität. Somit sind alle Verbindungen potenzielle Kandidaten für die klinische Anwendung in der PDD und der PDT.

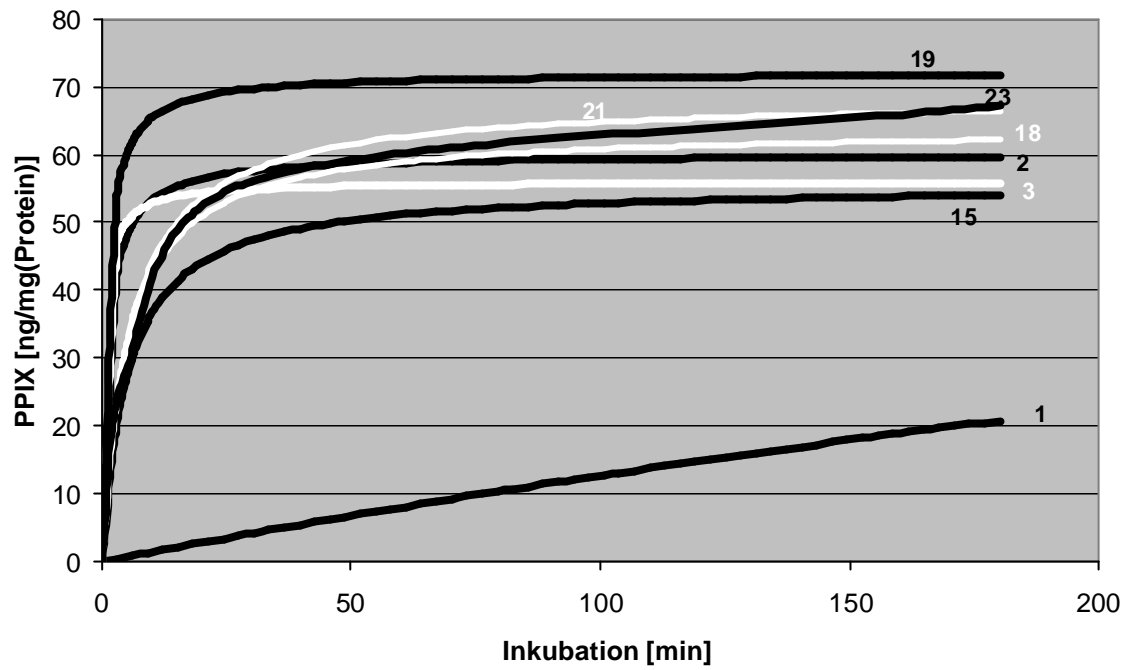
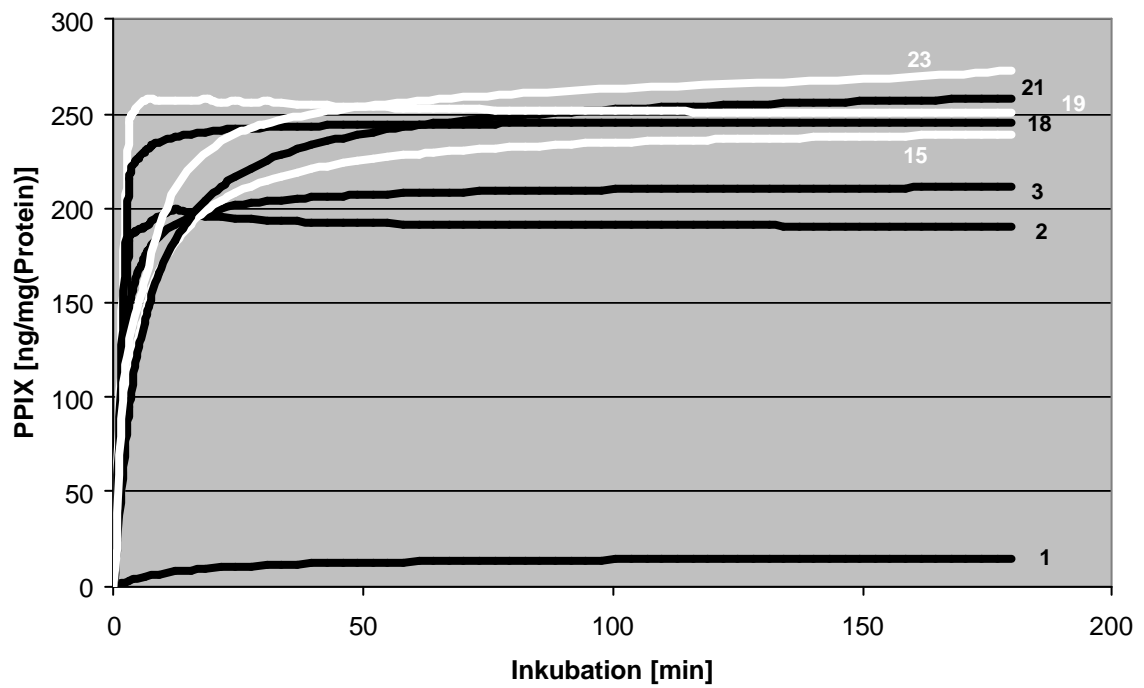
*Abbildung 34: MTT-Test UROTSA**Abbildung 35: MTT-Test J82*

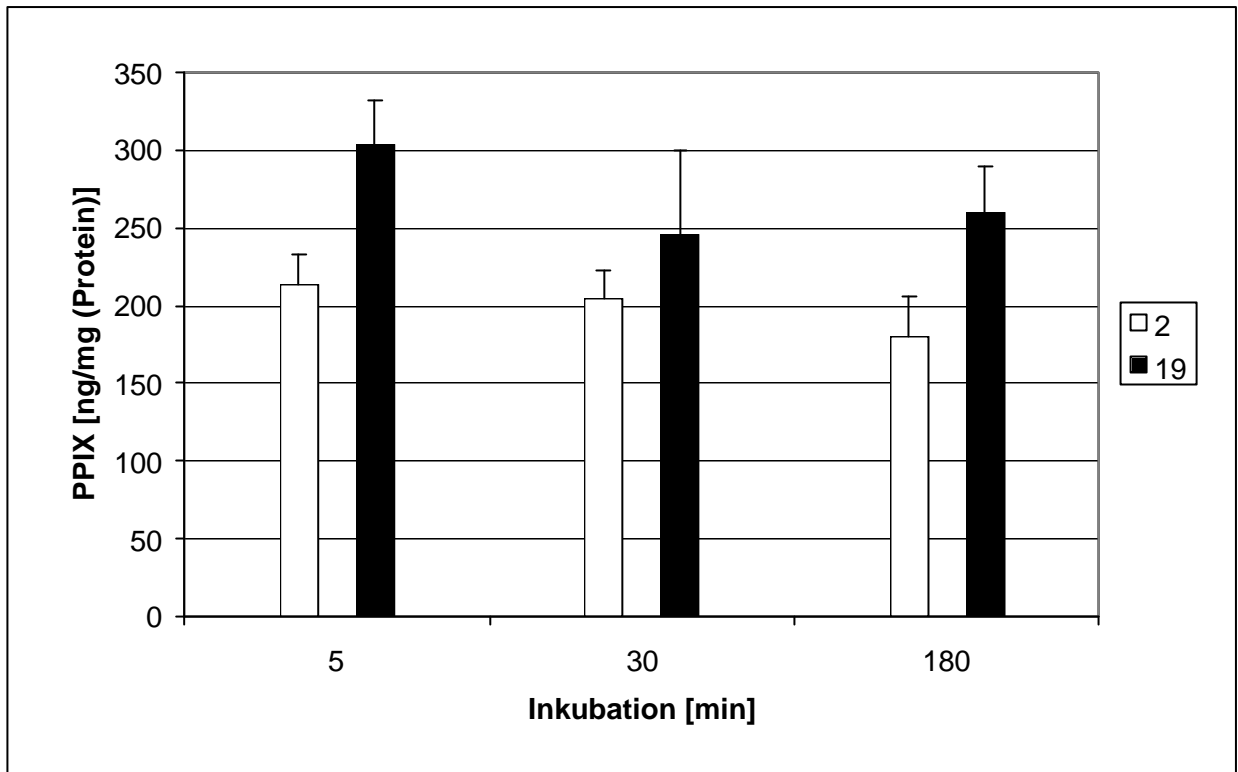
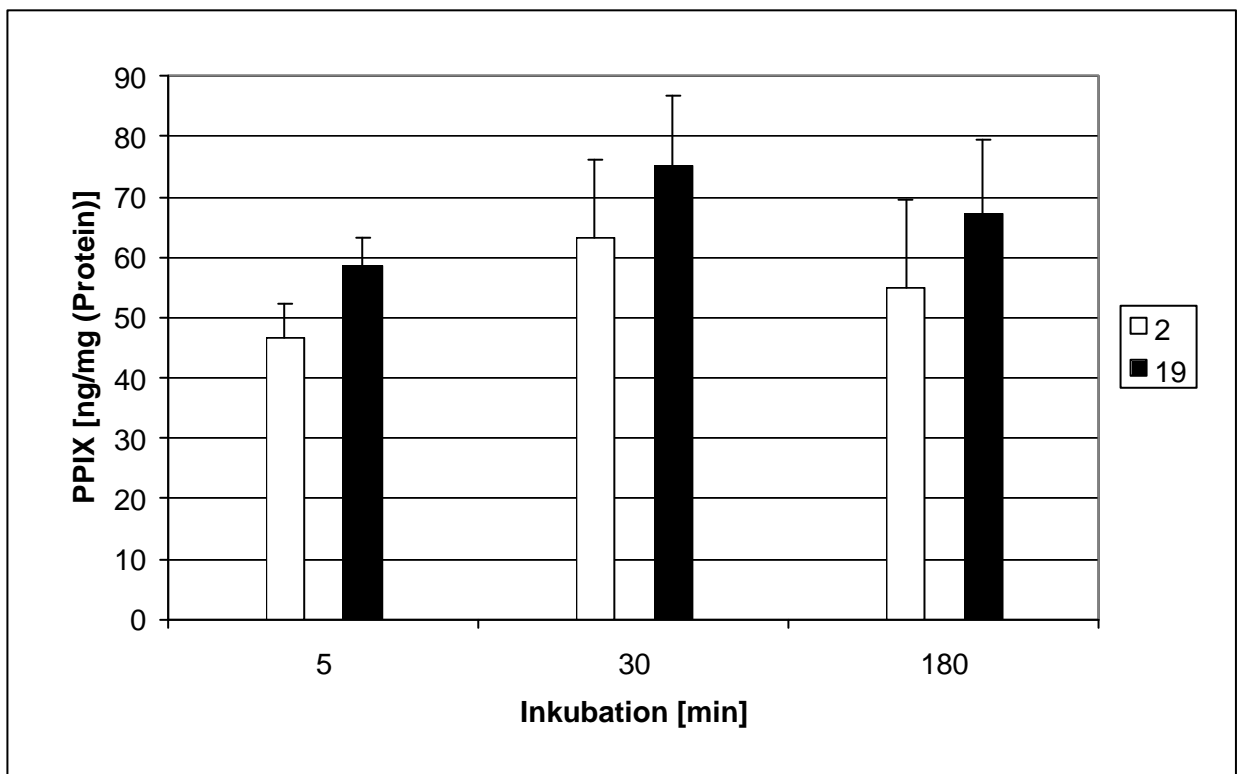


*Abbildung 36: MTT-Test HT29**Abbildung 37: MTT-Test CCD18*

## 6.3 Zeitabhängiges Screening

Im Rahmen der Diplomarbeit<sup>[73]</sup> wurde in einem konzentrationsabhängigen Screening der PPIX-Akkumulation die optimale Konzentration für eine Inkubation mit ALA-Hexyl- und ALA-Benzylester in HT29 ermittelt. Ab 0.12 mmol/l wurde keine signifikante Zunahme der PPIX-Akkumulation mehr beobachtet (Knickpunkt der Michaelis-Menten-Kurven: Substratsättigung). Ausgehend von dieser Sättigungskonzentration wurde in einem zeitabhängigen Screening der PPIX-Akkumulation die optimale Inkubationszeit für die neuen ALA-Derivate bestimmt. Neben der humanen Adenokarzinom-Zelllinie HT29 wurde die humane Urothelkarzinom-Zelllinie J82 zu den PPIX-Kinetiken herangezogen. Diese wurden mit 0.12 mmol/l ALA- bzw. ALA-Esterlösung (**2**, **3**, **15**, **18**, **19**, **21**, **23**) unterschiedlich lange (5, 30, 180 Minuten) in einem FKS-freien Medium inkubiert. Anschließend wurden sie mit PBS gespült und mit einem FKS-haltigen Medium versetzt. Nach einer Gesamtmetabolisierungsdauer von 3 Stunden wurde durchflusszytometrisch die PPIX-Anreicherung bestimmt. Unterschiedliche Inkubationszeiten bedingen verschiedene intrazelluläre Substratkonzentrationen. Die bei der PPIX-Biosynthese ablaufenden Enzymreaktionen können durch das Michaelis-Menten Gesetz beschrieben werden. Den Messwerten wurden Funktionen gemäß dem Michaelis-Menten-Gesetz eingepasst. In den Abbildungen 38 und 39 sind die Michaelis-Menten-Kurven dargestellt. Wie erwartet, führt eine Verkürzung der Inkubationszeit zu einer bevorzugten Esteraufnahme. Abbildung 38 zeigt besonders deutlich, dass der Unterschied zwischen ALA-Ester- und ALA-induzierter PPIX-Anreicherung mit einer Verringerung der Inkubationszeit drastisch zunimmt. Die Michaelis-Menten-Kurven der neuen Ester **19**, **21** und **23** verlaufen in beiden Zelllinien ab einer Inkubationszeit von ca. 30 Minuten oberhalb der Kurven des Hexylesters **2** und Benzylesters **3**. Besonders drastisch ist der sehr steile Kurvenanstieg des Nonafluorhexylesters **19** in beiden Zelllinien im Vergleich zu **2** und **3**. Auch nach sehr kurzen Inkubationszeiten (5 Minuten) induziert der Nonafluorhexylester **19** deutlich höhere PPIX-Level als der Hexylester **2** (Abb. 40, 41).

*Abbildung 38: Michaelis-Menten-Kurven J82**Abbildung 39: Michaelis-Menten-Kurven HT29*

*Abbildung 40: PPIX-Akkumulation in HT29**Abbildung 41: PPIX-Akkumulation in J82*

## 6.4 Tumorselektive PPIX-Akkumulation

Voraussetzung für die Anwendung in der PDD ist, dass sich die Substanzen gezielt in krankhaft veränderten Zellen anreichern und durch hohe PPIX-Akkumulation Dysplasien von gesundem Gewebe unterscheidbar machen. Es wurden das Verhältnis der PPIX-Produktion (0,12 mmol/l, 3 h) in HT29/CCD18 sowie J82/URO TSA durchflusszytometrisch bestimmt (Tabelle 4) sowie die entsprechenden Akkumulationsindices (Tabelle 5) berechnet und graphisch dargestellt. Im Folgenden wird der Akkumulationsindex als Verhältnis der PPIX-Akkumulation zwischen HT29 und CCD18 sowie zwischen J82 und URO TSA definiert. Bei der PPIX-Anreicherung in CCD18 und URO TSA waren im Vergleich zu den Karzinomzelllinien deutlich geringere substratspezifische Unterschiede zu beobachten. In der Kolonfibroblasten-Zelllinie CCD18 wurde eine sehr geringe PPIX-Akkumulation beobachtet, wohingegen sich in URO TSA erwartungsgemäß deutlich höhere PPIX-Level anreicherten, wodurch signifikant geringere Akkumulationsindices im Urothelmodell resultierten. In beiden *in vitro*-Modellen zeigen die Ester **2**, **19**, **21** und **23** signifikant höhere Akkumulationsindices als ALA **1**. Das Akkumulationsverhältnis konnte durch den ALA-Nonafluorhexylester **19** im Vergleich zu ALA im Kolon um das 15fache und im Urothel um das 1.6fache gesteigert werden. Im Kolonmodell HT29/CCD18 (Abb. 42) erzielen die neuen Ester **19**, **21** und **23** höhere Akkumulationsindices als der ALA-Hexylester **2**. Das Akkumulationsverhältnis konnte im Vergleich zum Hexylester um bis zu 47% erhöht werden. Im Urothelmodell J82/URO TSA (Abb. 43) erreichten die Verbindung **23** einen äquivalenten und die Verbindungen **19** und **21** einen um 17% höheren Akkumulationsindex im Vergleich zum Hexylester **2**.

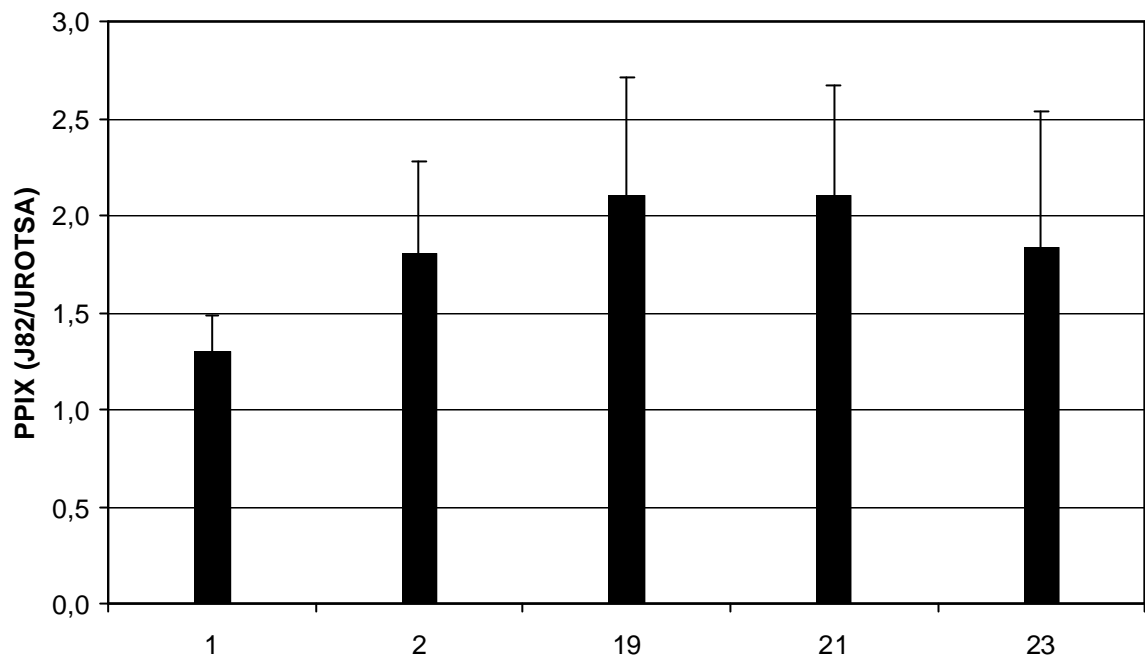


Abbildung 42: Akkumulationsindex (J82/UROTSA)

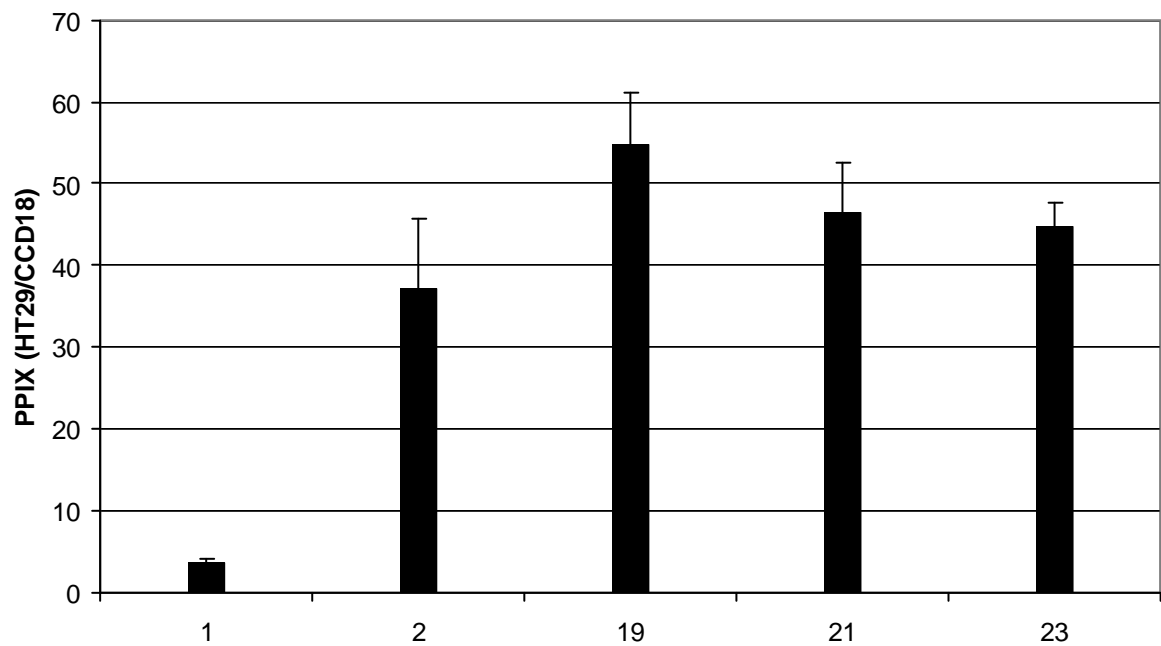


Abbildung 43: Akkumulationsindex (HT29/CCD18)

	<b>HT29</b>	<b>CCD18</b>	<b>J82</b>	<b>URO TSA</b>
ALA <b>1</b>	16.48±2.68	4.61±0.61	20.83±4.62	16.00±2.31
Hexylester <b>2</b>	180.57±25.89	4.86±1.12	55.06±14.56	30.46±8.00
Nonafluorhexylester <b>19</b>	259.93±29.40	4.74±0.63	67.22±12.10	31.92±9.24
Thiohexylester <b>21</b>	292.14±38.57	6.28±0.11	67.67±5.85	32.13±8.67
Dibenzylester <b>23</b>	276.51±17.34	6.17±0.31	69.77±6.00	38.99±14.46

Tabelle 4: Substrat- und zelllinienspezifische PPIX-Akkumulation [ng/mg (Protein)]

	<b>HT29/CCD18</b>	<b>J82/URO TSA</b>
ALA <b>1</b>	3.6±0.6	1.3±0.2
Hexylester <b>2</b>	37.2±8.5	1.8±0.5
Nonafluorhexylester <b>19</b>	54.8±6.2	2.1±0.6
Thiohexylester <b>21</b>	46.5±6.1	2.1±0.6
Dibenzylester <b>23</b>	44.8±2.8	1.8±0.7

Tabelle 5: Akkumulationsindices

Die Ergebnisse der Kapitel 6.1 bis 6.4 zeigen, dass die neu synthetisierten ALA-Ester **19**, **21** und **23** signifikant höhere PPIX-Akkumulationen als der ALA-Hexylester induzieren. Die Erhöhung der intrazellulären PPIX-Konzentration sollte aufgrund gesteigerter  $^1\text{O}_2$ -Produktion eine Zunahme der Phototoxizität der neuen Verbindungen im Vergleich zum Hexylester bewirken.

## 6.5 Phototoxizität

Bei der PDT soll der Tumor durch Bestrahlung möglichst vollständig zerstört und gleichzeitig das gesunde Gewebe maximal geschont werden. Um dies zu gewährleisten, sind große Unterschiede in den LD<sub>50</sub>-Werten zwischen krankem und gesundem Gewebe erforderlich. Um die Effektivität von PPIX als Photosensibilisator quantifizieren zu können, wurden Zellen (Kolon: HT29/CCD18, Urothel: J82/URO TSA) in der gewünschten Wachstumsdichte in 6-Well-Platten kultiviert und mit ALA- und ALA-Esterlösungen (0,12 mmol/l) im Dunkeln inkubiert (3 h, Medium ohne FKS).

Die Zellen wurden mit frischem Medium ohne FKS versehen und anschließend mit verschiedenen Energiedosen bestrahlt ( $\lambda=590\text{--}700\text{ nm}$ ,  $0\text{--}30\text{ J/cm}^2$ ,  $40\text{ mW/cm}^2$ ). Anschließend wurde mittels Klonogenitätstest die Zellvitalität bestimmt. Als Ergebnis erhält man den Vitalitätsgrad in Abhängigkeit von der applizierten Lichtdosis im Vergleich zur bestrahlten, nichtinkubierten Probe. Die prozentuale Zellvitalität wurde wie unter 5.6.3 beschrieben als Funktion der verabreichten Bestrahlungsdosis aufgetragen. Exemplarisch sind die Phototoxizitätskurven der beiden Karzinomzelllinien dargestellt (Abb. 44 und 45). Aus diesen Kurven wurden die zelllinien- und substratspezifischen  $\text{LD}_{50}$ -Werte ermittelt (Tabelle 6). Anschließend wurde das  $\text{LD}_{50}$ -Verhältnis HT29/CCD18 und J82/URO TSA berechnet (Tabelle 7) und graphisch in Form von Balkendiagrammen dargestellt (Abb. 46 und 47). Die phototoxische Wirkung sollte direkt proportional zur intrazellulären PPIX-Konzentration sein. Die unter 6.1 und 6.4 ermittelten PPIX-Akkumulationen und Akkumulationsindices sollten entsprechende  $\text{LD}_{50}$ -Werte bedingen. Die im Vergleich zu den ALA-Estern deutlich geringeren Akkumulationsindices von ALA entsprechen deutlich höheren  $\text{LD}_{50}$ -Werten in beiden Karzinomzelllinien. In J82 liegen die  $\text{LD}_{50}$ -Werte der ALA-Ester zwischen  $3.0\text{ J/cm}^2$  und  $4.75\text{ J/cm}^2$ , wohingegen ALA einen  $\text{LD}_{50}$ -Wert von  $20.5\text{ J/cm}^2$  erzielt. Analog hierzu induzieren die ALA-Ester in HT 29  $\text{LD}_{50}$ -Werte zwischen  $1.75\text{ J/cm}^2$  und  $4.3\text{ J/cm}^2$ , während ALA ein  $\text{LD}_{50}$ -Niveau von  $9.7\text{ J/cm}^2$  erzeugt. In J82 erzielt der ALA-Thiohexylester **21** in Analogie zum höchsten Akkumulationsindex auch das niedrigste  $\text{LD}_{50}$ -Verhältnis (Abb. 46). Entsprechend der geringeren substratspezifischen Unterschiede im Akkumulationsverhältnis im Urothelmodell (J82/URO TSA) induziert Verbindung **21** eine relativ geringe Erniedrigung des  $\text{LD}_{50}$ -Verhältnisses im Vergleich zum ALA-Hexylester **2**. In HT29 erreichen alle drei ALA-Ester **19**, **21** und **23** analog der höheren Akkumulationsindices auch signifikant kleinere  $\text{LD}_{50}$ -Verhältnisse als der ALA-Hexylester **2** (Abb. 47). Den besten Wert liefert hierbei der ALA-Dibenzylester **23** mit 0.11 und erzielt somit eine Absenkung des  $\text{LD}_{50}$ -Verhältnisses im Vergleich zum ALA-Hexylester **2** um 68%.



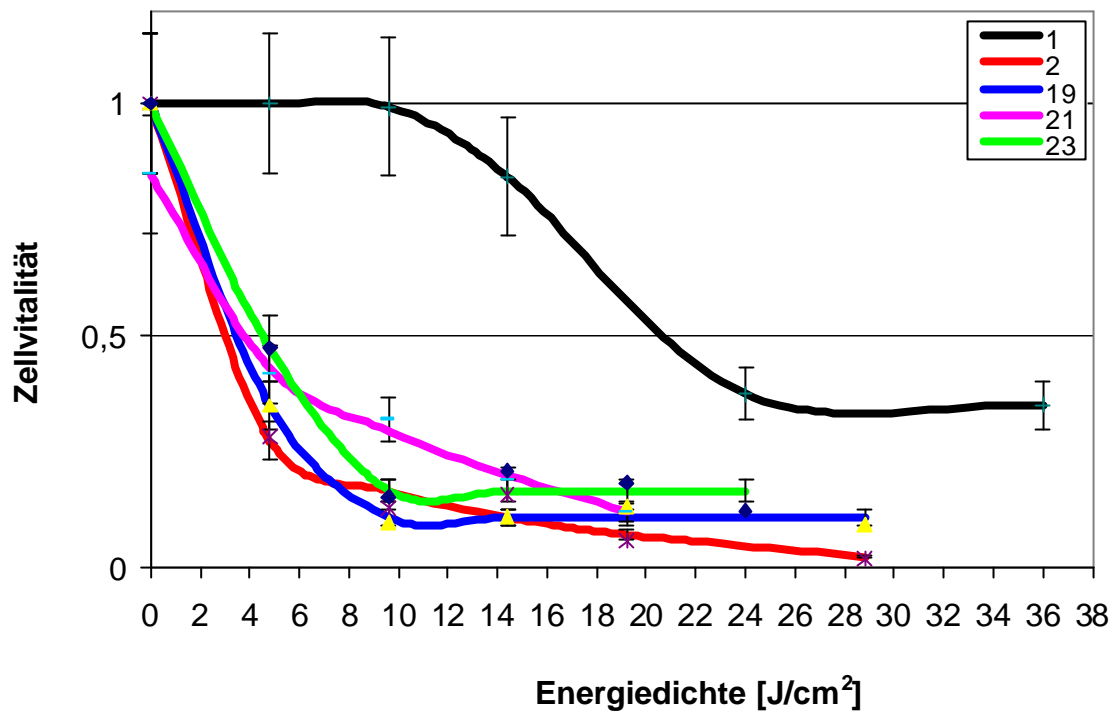


Abbildung 44: Phototoxizität J82

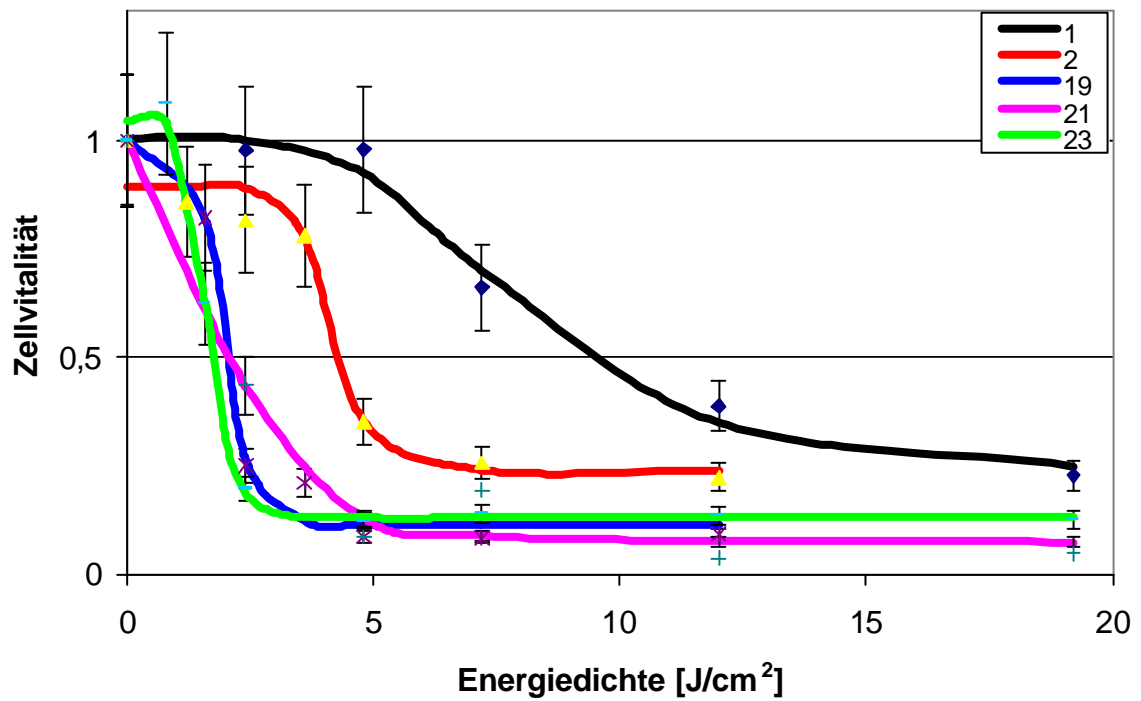
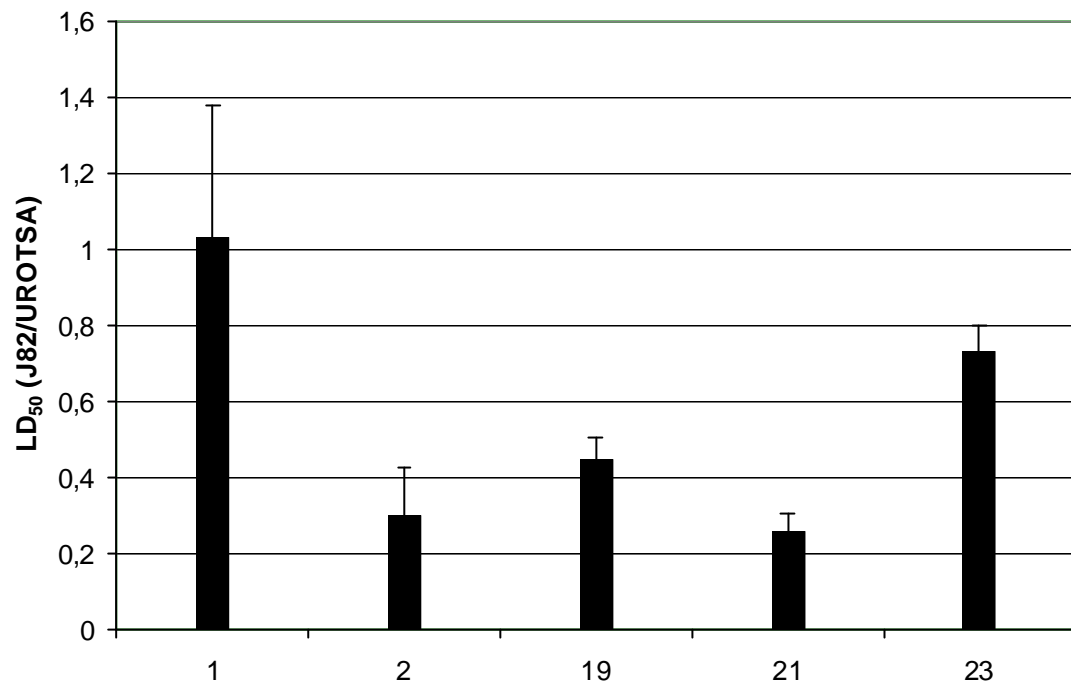
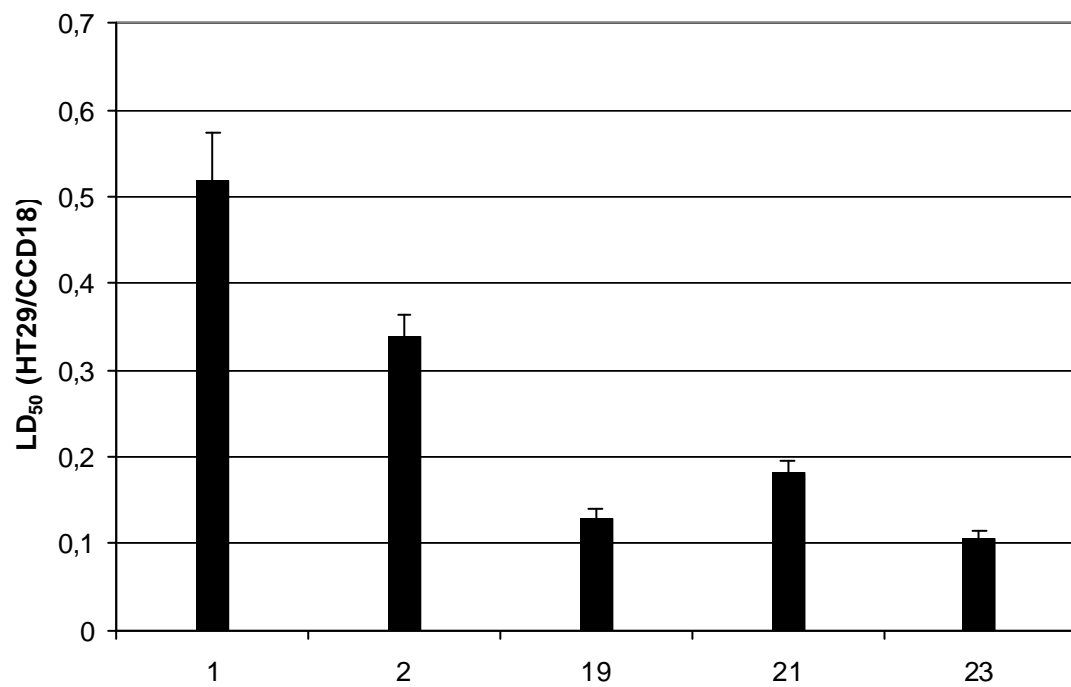


Abbildung 45: Phototoxizität HT29

Abbildung 46:  $LD_{50}$ -Verhältnis J82/UROTSAAbbildung 47:  $LD_{50}$ -Verhältnis HT29/CCD18

	<b>HT29</b>	<b>CCD18</b>	<b>J82</b>	<b>URO TSA</b>
<b>ALA 1</b>	9.70±0.90	18.50±1.07	20.50±1.55	19.90±0.69
<b>Hexylester 2</b>	4.30±0.24	12.70±0.77	3.00±0.32	10.00±1.54
<b>Nonafluorhexylester 19</b>	2.10±0.05	16.40±1.69	3.50±0.57	7.80±0.77
<b>Thiohexylester 21</b>	2.10±0.85	11.50±0.62	3.80±1.00	14.80±1.69
<b>Dibenzylester 23</b>	1.75±0.14	16.40±1.15	4.75±0.88	6.50±0.92

Tabelle 6: Substrat- und zelllinienspezifische  $LD_{50}$ -Werte [ $J/cm^2$ ]

	<b>HT29/CCD18</b>	<b>J82/URO TSA</b>
<b>ALA 1</b>	0.52±0.05	1.03±0.35
<b>Hexylester 2</b>	0.34±0.03	0.30±0.12
<b>Nonafluorhexylester 19</b>	0.13±0.01	0.45±0.05
<b>Thiohexylester 21</b>	0.18±0.01	0.25±0.06
<b>Dibenzylester 23</b>	0.11±0.01	0.73±0.07

Tabelle 7: Substratspezifische  $LD_{50}$ -Verhältnisse

## 6.6 Ausblick

Durch die neuen Verbindungen ALA-Nonafluorhexylester-hydrochlorid **19**, ALA-Thiohexylester-hydrochlorid **21** und Bis-ALA-1,4-Dibenzyl-diester-dihydrochlorid **23** konnten in den getesteten *in vitro*-Modellen die diagnostischen und therapeutischen Möglichkeiten deutlich verbessert werden. Die Ergebnisse der *in vitro*-Experimente (PPIX-Akkumulation, PPIX-Kinetik und Phototoxizität) dienen als Grundlage für anstehende *in vivo*-Testungen der Verbindungen an einem Rattenmodell. Hierbei werden die Substanzen für ihre Anwendung in der PDD im Gastrointestinaltrakt<sup>[74]</sup> getestet. In Zusammenarbeit mit der Abteilung für Innere Medizin I des Universitätsklinikums Regensburg wurde hierfür ein Antrag gestellt.

## 7 Experimenteller Teil

### 7.1 Allgemeines

#### 7.1.1 Arbeitsbedingungen

Alle Arbeiten wurden, soweit nicht anders vermerkt, unter Schutzgasatmosphäre mittels Schlenkrohrtechnik unter Benutzung von nachgereinigtem, getrocknetem Stickstoff durchgeführt. Geschlossene Apparaturen wurden über Quecksilber- bzw. Öl-Rückschlagventile mit Abgasleitungen verbunden. Die Trocknung und Stickstoffsättigung der verwendeten Lösungsmittel erfolgte nach gängigen Methoden in Umlaufapparaturen. Für die Chromatographie wurde als stationäre Phase Kieselgel 60 (Korngröße 0.063-0.200 mm, Fa. Merck) eingesetzt.

Die Vakuumangaben entsprechen folgenden Drücken:

Wasserstrahlvakuum (WV): 10-15 Torr

Ölpumpenvakuum (ÖV): 1-2 Torr

Hochvakuum (HV):  $10^{-3}$ - $10^{-2}$  Torr

### 7.1.2 Analytik

Zur Durchführung der analytischen Arbeiten wurden folgende Geräte eingesetzt:

*Schmelzpunkte:* Büchi SMP 20

Die angegebenen Schmelzpunkte sind nicht korrigiert.

*<sup>1</sup>H-NMR-Spektroskopie:* Bruker WM 250 (250 MHz), T = 24°C

Bruker Avance 300 (300 MHz), T = 27°C

Alle Spektren wurden in vollständig deuterierten Lösungsmitteln (Fa. Aldrich) und mit Tetramethylsilan (TMS) als internem (bei H<sub>2</sub>O als Lösungsmittel als externem) Standard aufgenommen.

Die chemischen Verschiebungen  $\delta$  werden in ppm und die Kopplungskontanten J in Hz angegeben.

Alle Spektren wurden nach erster Ordnung ausgewertet.

Die Multiplizitäten werden folgendermaßen abgekürzt:

s (Singulett), d (Dublett), t (Triplett), m (Multiplett)

*Massenspektrometrie:* Finnigan MAT 95

Finnigan MAT 112 S

Finnigan 311 A

ThermoQuest Finnigan TSQ 7000

Die Intensität der Peaks wird relativ zum stärksten Signal in Klammern angegeben.

Das jeweilige Molekülion wird dabei mit „M“ bezeichnet.

Angegeben ist jeweils der intensivste Peak.

*Elementaranalyse:*            Elementar vario EL *III*

Die Elementaranalysen wurden im Mikroanalytischen Labor der Naturwissenschaftlichen Fakultät IV – Chemie und Pharmazie der Universität Regensburg durchgeführt.

## 7.2 Allgemeine Arbeitsvorschriften (AAV)

### 7.2.1 AAV 1: Veresterung mit Thionylchlorid<sup>[49]</sup>

Die Veresterung wurde in Abwandlung eines japanischen Patents durchgeführt. Die verwendeten Alkohole dienten als Lösungsmittel. Sie wurden genauso wie das zur Veresterung benötigte Thionylchlorid im großen Überschuss eingesetzt, um die Ausbeute zu erhöhen. Zu 250 mmol trockenem Alkohol wurden unter Eiskühlung 3 ml (41.4 mmol) frisch destilliertes  $\text{SOCl}_2$  langsam zugetropft. Nach 20-minütigem Rühren bei RT wurden portionsweise 300 mg (1.79 mmol) 5-Aminolävulinsäure zugegeben. Zur Verbesserung der Löslichkeit wurden die Reaktionssuspensionen bei Bedarf im Ultraschallbad behandelt. Anschließend wurde der Ansatz ca. 1 h lang auf 60°C erhitzt. Nach Abziehen des LM und Umkristallisation aus MeOH/Ether konnten die Ester als Hydrochloride in reiner Form isoliert werden. Bei einer Vergrößerung des Reaktionsansatzes verschlechterte sich die Ausbeute, sodass die für Zelleexperimente benötigten Mengen in mehreren kleinen Ansätzen synthetisiert wurden.

### 7.2.2 AAV 2: Einführung von BOC-Schutzgruppen

Die Einführung von BOC-Schutzgruppen erfolgte je nach Ausgangsverbindung auf unterschiedliche Art und Weise: Zur Synthese von BOC-ALA<sup>[51]</sup> wurde der pH-Wert einer Lösung von 0.42 mg (2.5 mmol) 5-Aminolävulinsäure in 5 ml  $\text{H}_2\text{O}$  mit 0.1 N NaOH auf ca. 8.5 eingestellt. Nach Zugabe von 1.16 g Di-*tert*-butyldicarbonat (BOC-anhydrid) in 5 ml 1,4-Dioxan wurde die Lösung bei RT 18 h gerührt. Das überschüssige BOC-Anhydrid wurde durch zweifaches Ausschütteln mit 50 ml Diethylether entfernt. Nach Zugabe von 50 ml Essigsäureethylester wurden die wässrige Phase mit 1 N HCl angesäuert und die organische Phase abgetrennt. Nach zweimaligem Ausschütteln der wässrigen Phase mit je 25 ml Essigsäureethylester wurden die organischen Phasen vereint. Das LM wurde abgezogen und BOC-ALA als farbloses Öl isoliert.

Die Aminofunktionen von 1,3-Diamino-2-propanol und 3,4-Diaminobenzoesäure wurden durch Reaktion mit BOC-Anhydrid in Methanol geschützt<sup>[59]</sup>. Zu einer Lösung von 22 mmol der Diaminokomponente in 20 ml trockenem MeOH wurde langsam un-

ter Eiskühlung eine Lösung von 9.6 g (9.4 ml, 44 mmol) BOC-Anhydrid in 10 ml MeOH zugetropft. Nach 2 h Rühren bei RT wurde das LM abgezogen und aus Ether/PE umkristallisiert. Die BOC-geschützte Verbindung wurde als weißer Feststoff isoliert. 2,3-Diaminopropionsäure wurde durch Reaktion mit *tert*-Butyloxycarbonylazid-Lösung geschützt<sup>[61]</sup>. 1.00 g (7.00 mmol) DL-2,3-Diaminopropionsäuredihydrochlorid wurde in 5 ml Dioxan, 3 ml H<sub>2</sub>O und 10 ml Triethylamin aufgenommen. Nach 10 min Rühren bei RT wurde mit einer frisch hergestellten *tert*-Butyloxycarbonylazid-Lösung (25 mmol-Ansatz) versetzt. Nach 24-stündigem Rühren bei 50-55°C wurde die gelbe Reaktionsmischung zunächst, um Reste von *tert*-Butyloxycarbonylazid zu entfernen, fünfmal mit je 100 ml Diethylether extrahiert und die Etherphasen verworfen. Die verbleibende gelbe Lösung wurde mit konz. Zitronensäure angesäuert (pH 5) und mit Ether extrahiert. Nach Trocknung der organischen Phase über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Abziehen des LM und Umkristallisation aus Diethylether wurde das farblose Produkt im ÖV getrocknet.

### 7.2.3 AAV 3: Veresterung mit EDC<sup>[55]</sup>

Zu einer Lösung von 300 mg (1.3 mmol) N-BOC-5-Aminolävulinsäure, 120 mg (1.0 mmol) 4-Dimethylaminopyridin (DMAP) und 1.5 mmol des entsprechenden Alkohols in 15 ml trockenem CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> wurden unter Eiskühlung 257.4 mg (1.6 mmol) 1-Ethyl-3-[3-(dimethylamino)propyl]carbodiimid-hydrochlorid (EDC) zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde 2 h bei 0°C und anschließend 2 d bei RT gerührt. Nach Abziehen des LM wurde der Rückstand in einer Mischung aus 100 ml Essigester und 20 ml H<sub>2</sub>O aufgenommen. Zum Entfernen des wasserlöslichen Kupplungsreagens wurde die organische Phase je zweimal mit 30 ml gesättigter NaHCO<sub>3</sub>-Lösung und 20 ml H<sub>2</sub>O extrahiert. Nach Trocknung der organischen Phase über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> und Abziehen des LM wurde das Produkt säulenchromatographisch (SiO<sub>2</sub>, MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>: 40/1) gereinigt.



### 7.2.4 AAV 5: Abspaltung von BOC-Schutzgruppen<sup>[54]</sup>

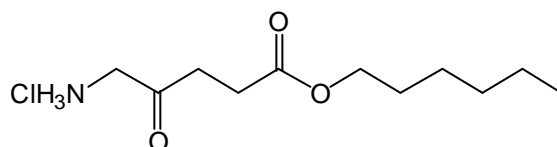
Zunächst wurde eine HCl-gesättigte Essigsäureethylesterlösung durch 8 h Einleiten von HCl-Gas in getrockneten Essigsäureethylester hergestellt. Diese wurde unter N<sub>2</sub> bei -20°C aufbewahrt. Anschließend wurden 0.25 mmol N-BOC-geschütztes ALA-Derivat unter Eiskühlung in 5 ml getrocknetem Essigsäureethylester gelöst und mit 5 ml HCl-gesättigtem Essigsäureethylester versetzt. Nach 30 min wurde das Eisbad entfernt und 3-5 h bei RT weitergerührt. Nach vollständiger Entschützung (DC-Kontrolle, Ninhydrinlösung) wurde die Lösung eingeeengt, was zur Fällung der in Essigester schwerlöslichen Hydrochloride führte. Der Niederschlag wurde unter N<sub>2</sub> abfiltriert und nach Umkristallisation (Essigester/PE) am ÖV getrocknet.

## 7.3. Synthese von Standardverbindungen

### 7.3.1 5-Aminolävulinsäurehexylester-hydrochlorid 2

Zu 20 ml (165 mmol) trockenem n-Hexanol wurden unter Eiskühlung 3 ml (41.4 mmol) frisch destilliertes SOCl<sub>2</sub> langsam zugetropft. Nach 20-minütigem Rühren bei RT wurden 500 mg (2.98 mmol) 5-Aminolävulinsäure portionsweise zugegeben und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde 45 min auf 60 °C erhitzt und das LM am HV abgezogen. Nach Umkristallisation aus MeOH/Ether erhielt man das Produkt in Form weißglänzender Blättchen (Flitter).

**C<sub>11</sub>H<sub>22</sub>ClNO<sub>3</sub> (251.5)**



**Ausbeute:** 272.5 mg (1.1 mmol; 36.4%)

**Schmp.:** 94°C

**PI-EIMS (70 eV):**  $m/z$  (%) = 215.2, [M-HCl] (2.7); 114.0, [C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>NO<sub>2</sub>] (9.4); 113.0, [C<sub>5</sub>H<sub>7</sub>NO<sub>2</sub>] (5.3); 36.0, [HCl] (34.3); 30.1, [CH<sub>4</sub>N] (100).

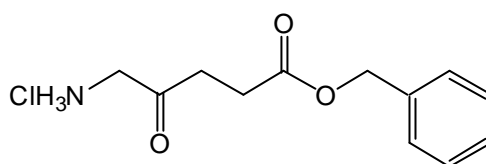
**<sup>1</sup>H-NMR** (250 MHz, D<sub>2</sub>O, 24°C, TMS):  $\delta$  [ppm] = 0.91 (t, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.33 (m, 6H, 3CH<sub>2</sub>), 1.62 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.67/2.83 (AA'BB'-System, 4H, 2CH<sub>2</sub>), 4.02 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 4.07 (t, <sup>3</sup>J(H-H) = 6.7 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>).

**Elementaranalyse:** [%] ber. C 52.5, H 8.8, N 5.6;

[%] gef. C 52.5, H 8.8, N 5.5.

### 7.3.2 5-Aminolävulinsäurebenzylester-hydrochlorid 3

Zu 20 ml (145.8 mmol) trockenem Benzylalkohol wurden unter Eiskühlung 3 ml (41.4 mmol) frisch destilliertes SOCl<sub>2</sub> langsam zugetropft. Nach 20-minütigem Rühren bei RT wurden zur entstandenen gelblichen Lösung portionsweise 500 mg (2.98 mmol) 5-Aminolävulinsäure zugegeben. Der Reaktionsansatz wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und anschließend wurde die Lösung 1 h lang auf 60°C erhitzt. Nach Abziehen des LM am HV und Umkristallisation aus CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/Ether konnte der Ester als weißes Pulver isoliert werden.



**C<sub>12</sub>H<sub>16</sub>ClNO<sub>3</sub> (257.5)**

**Ausbeute:** 231 mg (0.90 mmol, 30.2%)

**Schmp.:** 117°C

**PI-LSIMS (Glycerin/MeOH):**  $m/z$  (%) = 222.2, [MH-HCl] (100).

**$^1\text{H-NMR}$ :** (250 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $24^\circ\text{C}$ , TMS):  $\delta$  [ppm] = 2.63/2.84 (AA'BB'-System, 4H, 2CH<sub>2</sub>), 4.0 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 5.1 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 7.37 (m, 5H, CH, aromatisch).

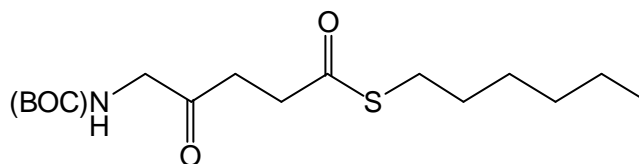
**Elementaranalyse:** [%] ber. C 55.9, H 6.2, N 5.4;  
[%] gef. C 55.7, H 6.3, N 5.4.

## 7.4 5-Aminolävulinsäurethioester

### 7.4.1 BOC-5-Aminolävulinsäurethiohexylester 21

Wie in AAV 3 beschrieben, wurden zu einer Lösung von 300 mg (1.3 mmol) N-BOC-5-Aminolävulinsäure, 120 mg (1.0 mmol) 4-Dimethylaminopyridin (DMAP) und 177 mg Hexanthiol (1.5 mmol) in 15 ml trockenem  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  unter Eiskühlung 257.4 mg (1.6 mmol) EDC zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde erst 2 h bei  $0^\circ\text{C}$  und anschließend 2 d bei RT gerührt. Nach Abziehen des LM wurde der Rückstand in einer Mischung aus 100 ml Essigester und 20 ml  $\text{H}_2\text{O}$  aufgenommen. Zum Entfernen des wasserlöslichen Kupplungsreagens wurde die organische Phase je zweimal mit 30 ml gesättigter  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung und 20 ml  $\text{H}_2\text{O}$  extrahiert. Nach Trocknung der organischen Phase über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  und Abziehen des LM wurde das Produkt säulenchromatographisch ( $\text{SiO}_2$ ,  $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ : 40/1) gereinigt und BOC-5-Aminolävulinsäurethiohexylester als gelbliches Öl isoliert.

**$\text{C}_{16}\text{H}_{29}\text{NO}_4\text{S}$  (331.5)**



**Ausbeute:** 302 mg (0.91 mmol; 69.7%)

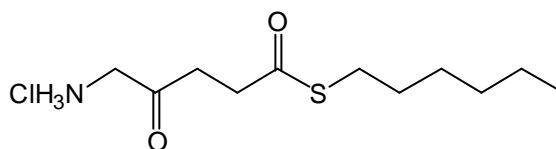
**PI-DCIMS ( $\text{NH}_3$ ):**  $m/z$  (%) = 349.2,  $[\text{M}+\text{NH}_4]$  (16.5); 293.2,  $[\text{M}+\text{NH}_4-\text{C}_4\text{H}_8]$  (100).

**$^1\text{H-NMR}$**  (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $24^\circ\text{C}$ , TMS):  $\delta$  [ppm] = 0.88 (t,  $^3J(\text{H-H}) = 6.8$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1.20-1.40 (m, 6H,  $3\text{CH}_2$ ), 1.45 (s, 9H, BOC), 1.57 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 2.70-3.0 (m, 6H,  $3\text{CH}_2$ ), 4.06 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 5.18 (breites s, 1H, NH).

**Elementaranalyse:** [%] ber. C 58.0, H 8.8, N 4.2;  
[%] gef. C 58.1, H 9.2, N 4.2.

#### 7.4.2 5-Aminolävulinsäurethiohexylester-hydrochlorid 21

Analog zu AAV 5 wurden 82.9 mg (0.25 mmol) BOC-5-Aminolävulinsäurethiohexylester unter Eiskühlung in 5 ml getrocknetem Essigsäureethylester gelöst und mit 5 ml HCl-gesättigtem Essigsäureethylester versetzt. Nach 30 min wurde das Eisbad entfernt und 5 h bei RT weitergerührt. Nach vollständiger Entschützung (DC-Kontrolle, Ninhydrinlösung) wurde die Lösung eingeeengt, was zur Fällung des in Essigsäure schwerlöslichen Hydrochlorids führte. Der farblose hygroskopische Feststoff wurde im ÖV getrocknet.



**$\text{C}_{11}\text{H}_{22}\text{ClNO}_2\text{S}$  (267.8)**

**Ausbeute:** 58 mg (0.21 mmol; 86.6%)

**PI-DCIMS ( $\text{NH}_3$ ):**  $m/z$  (%) = 232.2,  $[\text{MH-HCl}]$  (100).

**$^1\text{H-NMR}$**  (250 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ,  $24^\circ\text{C}$ , TMS):  $\delta$  [ppm] = 0.88 (t,  $^3J(\text{H-H}) = 6.8$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1.20-1.40 (m, 6H,  $3\text{CH}_2$ ), 1.55 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 2.79-3.14 (m, 6H,  $3\text{CH}_2$ ), 4.27 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 8.17 (breites s, 3H,  $\text{NH}_3$ ).

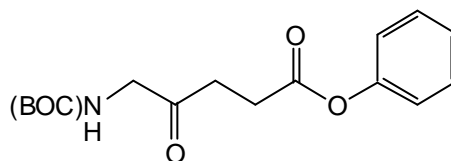
**Elementaranalyse:** [%] ber. C 49.3, H 8.3, N 5.2;  
[%] gef. C 49.2, H 8.3, N 5.3.

## 7.5 5-Aminolävulinsäurephenylester

### 7.5.1 BOC-5-Aminolävulinsäurephenylester

Wie in AAV 3 beschrieben, wurden zu einer Lösung von 300 mg (1.3 mmol) N-BOC-5-Aminolävulinsäure, 120 mg (1.0 mmol) 4-Dimethylaminopyridin (DMAP) und 141.2 mg Phenol (1.5 mmol) in 15 ml trockenem  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  unter Eiskühlung 257.4 mg (1.6 mmol) EDC zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde erst 2 h bei  $0^\circ\text{C}$  und anschließend 2 d lang bei RT gerührt. Nach Abziehen des LM wurde der Rückstand in einer Mischung aus 100 ml Essigester und 20 ml  $\text{H}_2\text{O}$  aufgenommen. Zum Entfernen des wasserlöslichen Kupplungsreagens wurde die organische Phase je zweimal mit 30 ml gesättigter  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung und 20 ml  $\text{H}_2\text{O}$  extrahiert. Nach Abziehen des LM wurde das Produkt säulenchromatographisch ( $\text{SiO}_2$ ,  $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ : 40/1) gereinigt und BOC-5-Aminolävulinsäurephenylester als gelbliches Öl isoliert.

**$\text{C}_{16}\text{H}_{21}\text{NO}_5$  (307.3)**



**Ausbeute:** 230.0 mg (0.75 mmol; 57.6%)

**PI-DCIMS ( $\text{NH}_3$ ):**  $m/z$  (%) = 325.3,  $[\text{M}+\text{NH}_4]$  (36.1); 269.9,  $[\text{M}+\text{NH}_4-\text{C}_4\text{H}_8]$  (100).

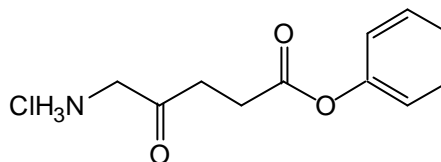
**$^1\text{H}$ -NMR** (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $24^\circ\text{C}$ , TMS):  $\delta$  [ppm] = 1.45 (s, 9H, BOC), 2.85/2.90 (AA'BB'-System, 4H,  $2\text{CH}_2$ ), 4.10 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 5.20 (breites s, 1H, NH), 7.0-7.4 (m, 5H, CH, aromatisch).

### 7.5.2 5-Aminolävulinsäurephenylester-hydrochlorid 16

Analog zu AAV 5 wurden 76.8 mg (0.25 mmol) BOC-5-Aminolävulinsäurephenylester unter Eiskühlung in 5 ml getrocknetem Essigsäureethylester gelöst und mit 5 ml

HCl-gesättigtem Essigsäureethylester versetzt. Nach 30 min wurde das Eisbad entfernt und 5 h bei RT weitergerührt. Nach der vollständigen Entschützung (DC-Kontrolle, Ninhydrinlösung) wurde das LM abgezogen und aus Essigester/PE umkristallisiert. Anschließend wurde der gelbliche Feststoff am ÖV getrocknet.

**C<sub>11</sub>H<sub>14</sub>ClNO<sub>3</sub> (243.7)**



**Ausbeute:** 52.6 mg (0.22 mmol; 86.3%)

**ESI (CH<sub>3</sub>OH, 1% HAc):** m/z (%) = 208.0, [MH-HCl] (100).

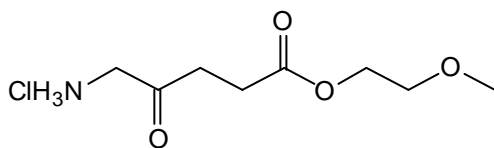
**<sup>1</sup>H-NMR** (250 MHz, D<sub>2</sub>O, 24°C, TMS): δ [ppm] = 2.65/2.80 (AA'BB'-System, 4H, 2CH<sub>2</sub>), 4.08 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 7.0-7.4 (m, 5H, CH, aromatisch).

## 7.6 5-Aminolävulinsäureoxaalkylester

### 7.6.1 5-Aminolävulinsäure-3-oxabutylester-hydrochlorid 4

Zu 19.0 g (250 mmol) 3-Oxabutanol wurden unter Eiskühlung 3 ml (41.4 mmol) frisch destilliertes SOCl<sub>2</sub> langsam zugetropft. Nach 20-minütigem Rühren bei RT wurden portionsweise 300 mg (1.79 mmol) 5-Aminolävulinsäure zugegeben. Anschließend wurde, nach 1 h Behandeln im Ultraschallbad, 45 min lang auf 60°C erhitzt. Nach Abziehen des LM wurde säulenchromatographisch gereinigt (SiO<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH: 50/1) und 5-Aminolävulinsäure-3-oxabutylester-hydrochlorid als gelbliches Öl isoliert.

**C<sub>8</sub>H<sub>16</sub>ClNO<sub>4</sub> (225.7)**



**Ausbeute:** 244.3 mg (1.1 mmol; 60.5%)

**PI-DCIMS (NH<sub>3</sub>):** m/z (%) = 190.0, [MH-HCl] (100).

**<sup>1</sup>H-NMR** (250 MHz, DMSO-D<sub>6</sub>, 24°C, TMS): δ [ppm] = 2.57/2.80 (AA'BB'-System, 4H, 2CH<sub>2</sub>), 3.26 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.52 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.96 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 4.12 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 8.29 (s, 3H, NH<sub>3</sub>).

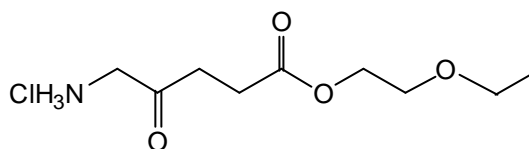
**Elementaranalyse:** [%] ber. C 42.5, H 7.2, N 6.2;

[%] gef. C 41.6, H 7.5, N 5.6.

### 7.6.2 5-Aminolävulinsäure-3-oxapentylester-hydrochlorid 5

Zu 22.6 g (250 mmol) 3-Oxapentanol wurden unter Eiskühlung 3 ml (41.4 mmol) frisch destilliertes SOCl<sub>2</sub> langsam zugetropft. Nach 20-minütigem Rühren bei RT wurden portionsweise 300 mg (1.79 mmol) 5-Aminolävulinsäure zugegeben. Anschließend wurde, nach 1 h Behandeln im Ultraschallbad, 45 min lang auf 60°C erhitzt. Nach Abziehen des LM und säulenchromatographischer Reinigung (SiO<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH: 50/1) wurde das Produkt als gelbliches Öl isoliert.

**C<sub>9</sub>H<sub>18</sub>ClNO<sub>4</sub> (239.5)**



**Ausbeute:** 268.0 mg (0.97 mmol; 54.3%)

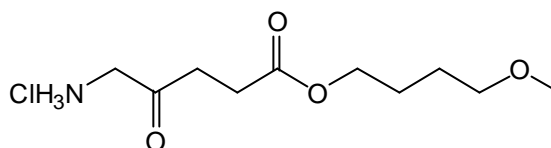
**PI-DCIMS (CH<sub>4</sub>):** m/z (%) = 204.2, [MH-HCl] (100).

**<sup>1</sup>H-NMR** (250 MHz, DMSO-D<sub>6</sub>, 24°C, TMS): δ [ppm] = 1.11 (m, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.58/2.79 (AA'BB'-System, 4H, 2CH<sub>2</sub>), 3.40-3.60 (m, 4H, 2CH<sub>2</sub>), 3.97 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 4.12 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 8.10 (s, 3H, NH<sub>3</sub>).

### 7.6.3 5-Aminolävulinsäure-5-oxahexylester-hydrochlorid 6

Zu 27 g (250 mmol) 5-Oxahexanol wurden unter Eiskühlung 3 ml (41.4 mmol) frisch destilliertes  $\text{SOCl}_2$  langsam zugetropft. Nach 20-minütigem Rühren bei RT wurden portionsweise 300 mg (1.79 mmol) 5-Aminolävulinsäure zugegeben. Anschließend wurde, nach einstündigem Behandeln im Ultraschallbad, 45 min auf 60 °C erhitzt. Nach Abziehen des LM wurde säulenchromatographisch gereinigt ( $\text{SiO}_2$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ : 50/1) und das Produkt als gelbliches Öl isoliert.

**$\text{C}_{10}\text{H}_{20}\text{ClNO}_4$  (253.7)**



**Ausbeute:** 279.1 mg (1.1 mmol; 59.2%)

**PI-DCIMS ( $\text{NH}_3$ ):**  $m/z$  (%) = 218.1,  $[\text{MH}-\text{HCl}]$  (100).

**$^1\text{H}$ -NMR** (250 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ , 24°C, TMS):  $\delta$  [ppm] = 1.56 (m, 4H,  $2\text{CH}_2$ ), 2.55/2.80 (AA'BB'-System, 4H,  $2\text{CH}_2$ ), 3.22 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 3.32 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 3.95 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 4.02 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 8.31 (s, 3H,  $\text{NH}_3$ ).

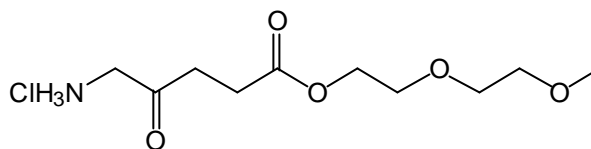
**Elementaranalyse:** [%] ber. C 47.3, H 7.9, N 5.5;

[%] gef. C 47.0, H 7.4, N 5.4.

### 7.6.4 5-Aminolävulinsäure-3,6-dioxaheptylester-hydrochlorid 7

Zu 30 g (250 mmol) 3,6-Dioxaheptanol wurden unter Eiskühlung 3 ml (41.4 mmol) frisch destilliertes  $\text{SOCl}_2$  langsam zugetropft. Nach 20-minütigem Rühren bei RT wurden portionsweise 300 mg (1.79 mmol) 5-Aminolävulinsäure zugegeben. Anschließend wurde, nach einstündigem Behandeln im Ultraschallbad, 45 min auf 60 °C erhitzt. Nach Abziehen des LM wurde säulenchromatographisch gereinigt ( $\text{SiO}_2$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ : 50/1) und das Produkt als gelbliches Öl isoliert.



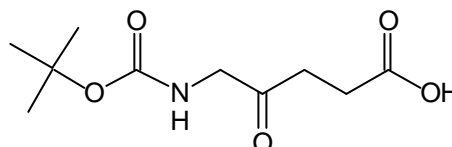
**C<sub>10</sub>H<sub>20</sub>ClNO<sub>5</sub> (269.7)****Ausbeute:** 207.7 mg (0.77 mmol; 42.8%)**PI-DCIMS (NH<sub>3</sub>):** m/z (%) = 234.0, [MH-HCl] (100).

**<sup>1</sup>H-NMR** (250 MHz, DMSO-D<sub>6</sub>, 24°C, TMS): δ [ppm] = 2.57/2.79 (AA'BB'-System, 4H, 2CH<sub>2</sub>), 3.3-3.6 (m, 7H, 2CH<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>), 3.77 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.97 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 4.11 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 8.05 (3H, NH<sub>3</sub>).

## 7.7 Synthese N-geschützter Aminolävulinsäure

### 7.7.1 BOC-5-Aminolävulinsäure 10<sup>[50]</sup>

Zur Synthese von BOC-ALA wurde der pH-Wert einer Lösung von 0.42 mg (2.5 mmol) 5-Aminolävulinsäure in 5 ml H<sub>2</sub>O mit 0.1 N NaOH auf 8.5 eingestellt. Nach Zugabe von 1.16 g (5.3 mmol) Di-*tert*-butyldicarbonat in 5 ml 1,4-Dioxan wurde die Lösung 18 h bei RT gerührt. Das überschüssige BOC-Anhydrid wurde durch zweifaches Ausschütteln mit 50 ml Diethylether entfernt. Nach Zugabe von 50 ml Essigsäureethylester wurde die wässrige Phase mit 1 N HCl angesäuert und die organische Phase abgetrennt. Nach zweimaligem Ausschütteln der wässrigen Phase mit je 25 ml Essigsäureethylester wurden die organischen Phasen vereint und das LM abgezogen. BOC-ALA wurde als farbloses Öl isoliert.

**C<sub>10</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>5</sub> (231,3)****Ausbeute:** 419 mg (1.8 mmol; 72.5%)

**PI-DCIMS (NH<sub>3</sub>):**  $m/z$  (%) = 249.2, [M+NH<sub>4</sub>] (47.28); 193.1, [M+NH<sub>4</sub>-C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>] (100).

**<sup>1</sup>H-NMR** (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 24°C, TMS):  $\delta$  [ppm] = 1.45 (s, 9H, BOC), 2.72 (m, 4H, 2CH<sub>2</sub>), 4.08 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 5.25 (breites s, 1H, NH).

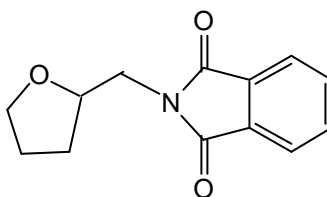
**Elementaranalyse:** [%] ber. C 51.9, H 7.4, N 6.1;

[%] gef. C 51.6, H 7.2, N 6.2.

### 7.7.2 5-Aminolävulinsäurephthalimid 11<sup>[51]</sup>

Die zweistufige Synthese erfolgt gemäß eines europäischen Patents. Im ersten Schritt wurde die Aminofunktion von Tetrahydrofurfurylamin geschützt. Hierzu wurden zu einer Lösung von 19.8 g (134 mmol) Phthalsäureanhydrid in 500 ml Chloroform unter Rühren 10 g (99 mmol) Tetrahydrofurfurylamin zugegeben. Nach 14 h Rückflussskochen im Wasserabscheider wurde die Reaktionsmischung mit 300 ml gesättigter NaHCO<sub>3</sub>-Lösung extrahiert. Die wässrige Phase wurde dreimal mit je 50 ml Chloroform ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Phasen wurden anschließend dreimal mit je 50 ml H<sub>2</sub>O extrahiert und über MgSO<sub>4</sub> getrocknet. Abziehen des LM und anschließende Umkristallisation aus CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/PE ergab N-Tetrahydrofurfurylphthalimid als farblosen Feststoff.

**C<sub>13</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>3</sub> (231.3)**



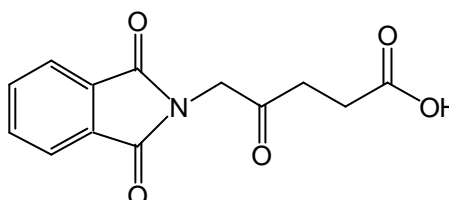
**Ausbeute:** 20.1 g (86.9 mmol; 89.0%)

**Schmp.:** 86°C-87°C

**<sup>1</sup>H-NMR** (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 24°C, TMS):  $\delta$  [ppm] = 1.60-1.75 (m, 1H), 1.80-2.10 (m, 3H), 3.60-4.00 (m, 4H), 4.20-4.30 (m, 1H, CH), 7.65-7.75 (m, 2H, aromatisch), 7.81-7.90 (m, 2H, aromatisch).

Die zweite Stufe stellte die oxidative Ringöffnung des N-Tetrahydrofurfurylphthalimids dar. Hierbei wurden zu einer Mischung aus 50 ml  $\text{CCl}_4$ , 243 ml  $\text{CH}_3\text{CN}$  und 73 ml  $\text{H}_2\text{O}$  7.3 g (31.6 mmol) N-Tetrahydrofurfurylphthalimid, 41.3 g (189.5 mmol)  $\text{NaIO}_4$  und 145 mg (2.2 mol %)  $\text{RuCl}_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$  zugegeben. Nach 14 h Rückflusskochen unter heftigem Rühren wurde das LM-Gemisch im ÖV abgezogen. Der Rückstand wurde mit einer Mischung aus 100 ml  $\text{CHCl}_3$  und 20 ml 1N HCl versetzt. Nach dreimaliger Extraktion der wässrigen Phase mit 30 ml  $\text{CHCl}_3$  wurden die vereinigten organischen Phasen über  $\text{NaSO}_4$  getrocknet und das LM wurde abgezogen. Säulenchromatographische Reinigung mit einem Laufmittelgemisch aus Chloroform/Methanol/Ameisensäure (95/4/1) ergab das Produkt als farblosen Feststoff.

**$\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{NO}_5$  (261.2)**



**Ausbeute:** 2.3 g (8.8 mmol; 31.5%)

**PI-DCIMS ( $\text{NH}_3$ ):**  $m/z$  (%) = 279.2,  $[\text{M}+\text{NH}_4]$  (100).

**$^1\text{H-NMR}$**  (250 MHz,  $\text{DMSO-D}_6$ , 24°C, TMS):  $\delta$  [ppm] = 2.50/2.83 (AA'BB'-System, 4H, 2 $\text{CH}_2$ ), 4.61 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 7.87-7.94 (m, 4H, CH, aromatisch), 12.19 (1H, COOH).

**Elementaranalyse:** [%] ber. C 59.8, H 4.2; N 5.4;

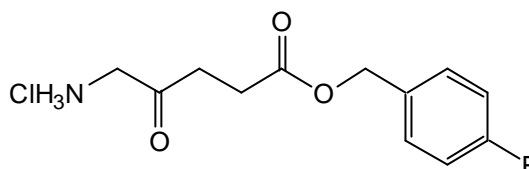
[%] gef. C 59.3, H 4.3, N 5.2.

## 7.8 Synthese substituierter 5-Aminolävulinsäurebenzylester

### 7.8.1 5-Aminolävulinsäure-p-fluorbenzylester-hydrochlorid 8

Zu 31.5 g (250 mmol) p-Fluorbenzylalkohol wurden unter Eiskühlung 3 ml (41.4 mmol) frisch destilliertes  $\text{SOCl}_2$  langsam zugetropft. Nach 20-minütigem Rühren bei RT wurden portionsweise 300 mg (1.79 mmol) 5-Aminolävulinsäure zugegeben. Anschließend wurde, nach einstündigem Behandeln im Ultraschallbad, 45 min auf 60°C erhitzt. Nach Abziehen des LM wurde säulenchromatographisch gereinigt ( $\text{SiO}_2$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ : 50/1) und das Produkt als farbloser Feststoff isoliert.

**$\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{ClFNO}_3$  (275.7)**



**Ausbeute:** 204 mg (0.74 mmol; 41.3%)

**PI-DCIMS ( $\text{NH}_3$ ):**  $m/z$  (%) = 240.3,  $[\text{MH}-\text{HCl}]$  (66); 133.1,  $[\text{C}_5\text{H}_{11}\text{NO}_3]$  (100).

**$^1\text{H}$ -NMR** (250 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , 24°C, TMS):  $\delta$  [ppm] = 2.62/2.83 (AA'BB'-System, 4H, 2 $\text{CH}_2$ ), 3.98 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 5.08 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 7.19/7.41 (m, 4H, 4CH, aromatisch).

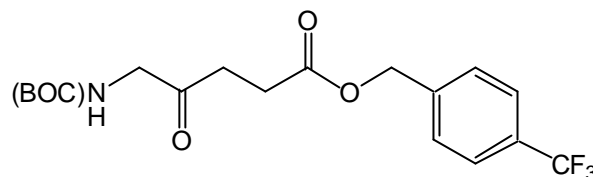
**Elementaranalyse:** [%] ber. C 52.3, H 5.5, N 5.1;  
[%] gef. C 51.8, H 4.8, N 4.7.

### 7.8.2 BOC-5-Aminolävulinsäure-p-trifluormethylbenzylester

Analog zu AAV 3 wurden zu einer Lösung von 300 mg (1.3 mmol) N-BOC-5-Aminolävulinsäure, 120 mg (1.0 mmol) 4-Dimethylaminopyridin (DMAP) und 264.2 mg (1.5 mmol) 4-Trifluormethylbenzylalkohol in 15 ml trockenem  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  unter Eiskühlung 257.4 mg (1.6 mmol) EDC zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde 2 h bei 0°C und anschließend 2 d bei RT gerührt. Nach Abziehen des LM wurde der Rück-

stand in einer Mischung aus 100 ml Essigester und 20 ml H<sub>2</sub>O aufgenommen. Zum Entfernen des wasserlöslichen Kupplungsreagens wurde die organische Phase je zweimal mit 30 ml gesättigter NaHCO<sub>3</sub>-Lösung und 20 ml H<sub>2</sub>O extrahiert. Nach Trocknung über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> und Abziehen des LM wurde das Produkt säulenchromatographisch (SiO<sub>2</sub>, MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>: 40/1) gereinigt und BOC-5-Aminolävulinsäure-4-trifluormethylbenzylester als gelbliches Öl isoliert.

**C<sub>18</sub>H<sub>22</sub>F<sub>3</sub>NO<sub>5</sub> (389.4)**



**Ausbeute:** 312.6 mg (0.8 mmol; 62.0%)

**PI-DCIMS (NH<sub>3</sub>):** m/z (%) = 407.5, [M+NH<sub>4</sub>] (35.1); 351.4, [M+NH<sub>4</sub>-C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>] (100).

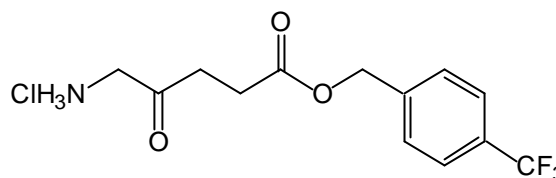
**<sup>1</sup>H-NMR** (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 24°C, TMS): δ [ppm] = 1.45 (s, 9H, BOC), 2.70/2.75 (AA`BB`-System, 4H, 2CH<sub>2</sub>), 4.05 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 5.16 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 7.40-7.60 (m, 4H, 4CH, aromatisch).

**Elementaranalyse:** [%] ber. C 55.5, H 5.7, N 3.6;

[%] gef. C 55.7, H 6.0, N 4.0.

### 7.8.3 5-Aminolävulinsäure-p-trifluormethylbenzylester-hydrochlorid 12

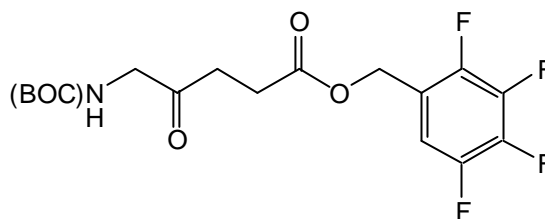
Wie in AAV 5 beschrieben, wurden 97.4 mg (0.25 mmol) BOC-5-Aminolävulinsäure-3-trifluormethylbenzylester unter Eiskühlung in 5 ml getrocknetem Essigsäureethylester gelöst und mit 5 ml HCl-gesättigtem Essigsäureethylester versetzt. Nach 30 min wurde das Eisbad entfernt und 4 h bei RT weitergerührt, wobei eine Trübung der Lösung auftrat. Der farblose Feststoff wurde unter N<sub>2</sub> abfiltriert und nach Umkristallisation (Essigester/PE) im ÖV getrocknet.

**C<sub>13</sub>H<sub>15</sub>ClF<sub>3</sub>NO<sub>3</sub> (325.7)****Ausbeute:** 74.9 mg (0.23 mmol; 91.9%)**PI-DCIMS (NH<sub>3</sub>):** m/z (%) = 290.4, [MH-HCl] (100).

**<sup>1</sup>H-NMR** (250 MHz, D<sub>2</sub>O, 24°C, TMS): δ [ppm] = 2.65/2.80 (AA'BB'-System, 4H, 2CH<sub>2</sub>), 4.08 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 5.10 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 7.45-7.62 (m, 4H, 4CH, aromatisch).

#### 7.8.4 BOC-5-Aminolävulinsäure-2,3,4,5-tetrafluorbenzylester

Wie in AAV 3 beschrieben, wurden zu einer Lösung von 300 mg (1.3 mmol) N-BOC-5-Aminolävulinsäure, 120 mg (1.0 mmol) 4-Dimethylaminopyridin (DMAP) und 270.2 mg (1.5 mmol) 2,3,4,5-Tetrafluorbenzylalkohol in 15 ml trockenem CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> unter Eiskühlung 257.4 mg (1.6 mmol) EDC zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde 2 h bei 0°C und anschließend 2 d bei RT gerührt. Nach Abziehen des LM wurde der Rückstand in einer Mischung aus 100 ml Essigester und 20 ml H<sub>2</sub>O aufgenommen. Zum Entfernen des wasserlöslichen Kupplungsreagens wurde die organische Phase je zweimal mit 30 ml gesättigter NaHCO<sub>3</sub>-Lösung und 20 ml H<sub>2</sub>O extrahiert. Nach Trocknung über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> und Abziehen des LM wurde das Produkt säulenchromatographisch (SiO<sub>2</sub>, MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>: 40/1) gereinigt und BOC-5-Aminolävulinsäure-2,3,4,5-tetrafluorbenzylester als gelbliches Öl isoliert.

**C<sub>17</sub>H<sub>19</sub>F<sub>4</sub>NO<sub>5</sub> (393.3)****Ausbeute:** 336.3 mg (0.86 mmol; 65.8%)**PI-DCIMS (NH<sub>3</sub>):** m/z (%) = 411.4, [M+NH<sub>4</sub>] (35.8); 355.3, [M+NH<sub>4</sub>-C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>] (100).

**$^1\text{H-NMR}$**  (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $24^\circ\text{C}$ , TMS):  $\delta$  [ppm] = 1.45 (s, 9H, BOC), 2.70/2.75 (AA'BB'-System, 4H,  $2\text{CH}_2$ ), 4.05 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 5.19 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 6.98 (m, 1H, CH, aromatisch).

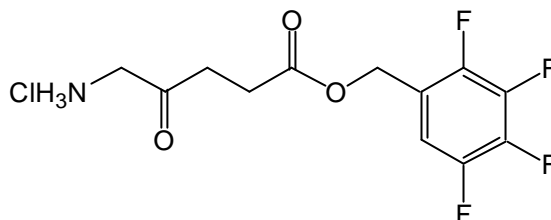
**Elementaranalyse:** [%] ber. C 51.9, H 4.9, N 3.6;

[%] gef. C 51.8, H 5.2, N 3.6.

### 7.8.5 5-Aminolävulinsäure-2,3,4,5-tetrafluorbenzylester-hydrochlorid 13

Wie in AAV 5 beschrieben, wurden 98.3 mg (0.25 mmol) BOC-5-Aminolävulinsäure-tetrafluorbenzylester unter Eiskühlung in 5 ml getrocknetem Essigsäureethylester gelöst und mit 5 ml HCl-gesättigtem Essigsäureethylester versetzt. Nach 30 min wurde das Eisbad entfernt und 4 h bei RT weitergerührt. Nach vollständiger Entschützung (DC-Kontrolle, Ninhydrinlösung) wurde das LM abgezogen und das Produkt nach Umkristallisation (Essigester/PE) als gelbliches Öl isoliert.

**$\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{ClF}_4\text{NO}_3$  (329.7)**



**Ausbeute:** 77.1 mg (0.23 mmol; 93.5%)

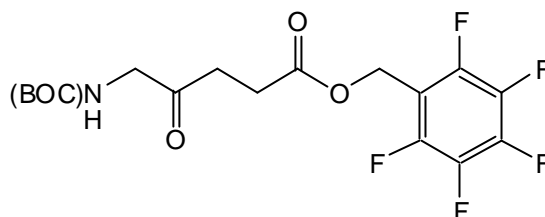
**ESI ( $\text{CH}_3\text{OH}$ , 1% HAc):**  $m/z$  (%) = 294.0, [MH-HCl] (100).

**$^1\text{H-NMR}$**  (250 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ,  $24^\circ\text{C}$ , TMS):  $\delta$  [ppm] = 2.65/2.80 (AA'BB'-System, 4H,  $2\text{CH}_2$ ), 4.08 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 5.10 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 7.12 (1H, CH, aromatisch).

### 7.8.6 BOC-5-Aminolävulinsäurepentafluorbenzylester

Wie in AAV 3 beschrieben, wurden zu einer Lösung von 300 mg (1.3 mmol) N-BOC-5-Aminolävulinsäure, 120 mg (1.0 mmol) 4-Dimethylaminopyridin (DMAP) und 297.1 mg (1.5 mmol) Pentafluorbenzylalkohol in 15 ml trockenem  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  unter Eiskühlung 257.4 mg (1.6 mmol) EDC zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde 2 h bei  $0^\circ\text{C}$  und anschließend 2 d bei RT gerührt. Nach Abziehen des LM wurde der Rückstand in einer Mischung aus 100 ml Essigester und 20 ml  $\text{H}_2\text{O}$  aufgenommen. Zum Entfernen des wasserlöslichen Kupplungsreagens wurde die organische Phase je zweimal mit 30 ml gesättigter  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung und 20 ml  $\text{H}_2\text{O}$  extrahiert. Nach Trocknung über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  und Abziehen des LM wurde das Produkt säulenchromatographisch ( $\text{SiO}_2$ ,  $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ : 40/1) gereinigt und BOC-5-Aminolävulinsäurepentafluorbenzylester als gelbliches Öl isoliert.

**$\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{F}_5\text{NO}_5$  (411.3)**



**Ausbeute:** 336.3 mg (0.82 mmol; 63.1%)

**PI-DCIMS ( $\text{NH}_3$ ):**  $m/z$  (%) = 429.3,  $[\text{M}+\text{NH}_4]$  (32.7); 373.2,  $[\text{M}+\text{NH}_4-\text{C}_4\text{H}_8]$  (88.7); 193.1,  $[\text{MH}+\text{NH}_4-\text{C}_4\text{H}_8-\text{C}_7\text{F}_5\text{H}_2]$  (100).

**$^1\text{H}$ -NMR** (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $24^\circ\text{C}$ , TMS):  $\delta$  [ppm] = 1.45 (s, 9H, BOC), 2.57/2.69 (AA'BB'-System, 4H,  $2\text{CH}_2$ ), 4.05 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 5.13 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ ).

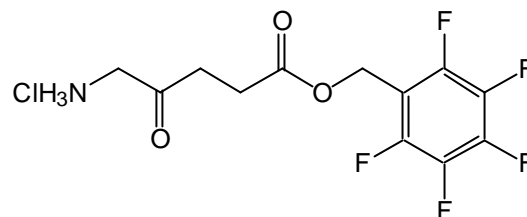
### 7.8.7 5-Aminolävulinsäurepentafluorbenzylester-hydrochlorid 14

Wie in AAV 5 beschrieben, wurden 102.8 mg (0.25 mmol) BOC-5-Aminolävulinsäurepentafluorbenzylester unter Eiskühlung in 5 ml getrocknetem Essigsäureethylester gelöst und mit 5 ml HCl-gesättigtem Essigsäureethylester versetzt. Nach 30 min wurde das Eisbad entfernt und 4 h bei RT weitergerührt. Nach vollständiger Entschüt-



zung (DC-Kontrolle, Ninhydrinlösung) wurde das LM abgezogen und das Produkt als gelbliches Öl isoliert.

**C<sub>12</sub>H<sub>11</sub>ClF<sub>5</sub>NO<sub>3</sub> (347.7)**



**Ausbeute:** 77.1 mg (0.22 mmol; 88%)

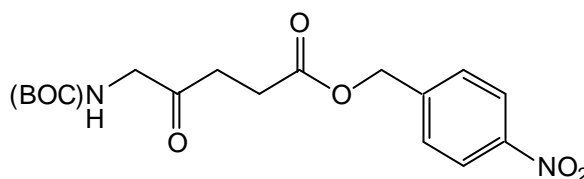
**PI-DCIMS (NH<sub>3</sub>):** m/z (%) = 312.1, [MH-HCl] (62.2); 133.1, [C<sub>5</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>3</sub>] (100).

**<sup>1</sup>H-NMR** (250 MHz, D<sub>2</sub>O, 24°C, TMS): δ [ppm] = 2.59/2.79 (AA'BB'-System, 4H, 2CH<sub>2</sub>), 3.98 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 5.17 (s, 2H, CH<sub>2</sub>).

#### 7.8.8 BOC-5-Aminolävulinsäure-p-nitrobenzylester

In Anlehnung an AAV 3 wurden zu einer Lösung von 300 mg (1.3 mmol) BOC-5-Aminolävulinsäure, 120 mg (1.0 mmol) 4-Dimethylaminopyridin (DMAP) und 229.7 mg (1.5 mmol) 4-Nitrobenzylalkohol in 15 ml trockenem CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> unter Eiskühlung 257.4 mg (1.6 mmol) EDC zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde 2 h bei 0°C und anschließend 2 d bei RT gerührt. Nach Abziehen des LM wurde der Rückstand in einer Mischung aus 100 ml Essigester und 20 ml H<sub>2</sub>O aufgenommen. Zum Entfernen des wasserlöslichen Kupplungsreagens wurde die organische Phase je zweimal mit 30 ml gesättigter NaHCO<sub>3</sub>-Lösung und 20 ml H<sub>2</sub>O extrahiert. Nach Trocknung über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> und Abziehen des LM wurde das Produkt säulenchromatographisch (SiO<sub>2</sub>, MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>: 40/1) gereinigt und BOC-5-Aminolävulinsäure-p-nitrobenzyl-ester als farbloser Feststoff isoliert.

**C<sub>17</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub> (366.4)**



**Ausbeute:** 257.3 mg (0.70 mmol; 54.0%)

**PI-DCIMS (NH<sub>3</sub>):** m/z (%) = 384.4, [M+NH<sub>4</sub>] (40); 328.3, [M+NH<sub>4</sub>-C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>] (100).

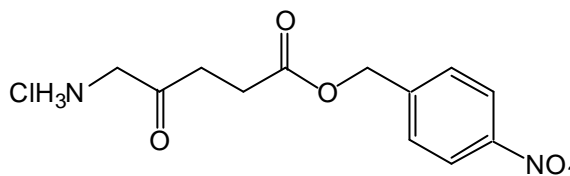
**<sup>1</sup>H-NMR** (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 24°C, TMS): δ [ppm] = 1.45 (s, 9H, BOC), 2.73/2.79 (AA'BB'-System, 4H, 2CH<sub>2</sub>), 4.05 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 5.21 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 7.52/8.22 (m, 4H, 4CH, aromatisch).

**Elementaranalyse:** [%] ber. C 55.7, H 6.1, N 7.6;

[%] gef. C 55.7, H 6.0, N 7.4.

### 7.8.9 5-Aminolävulinsäure-p-nitrobenzylester-hydrochlorid 15

Wie in AAV 5 beschrieben, wurden 91.6 mg (0.25 mmol) BOC-5-Aminolävulinsäure-p-nitrobenzylester unter Eiskühlung in 5 ml getrocknetem Essigsäureethylester gelöst und mit 5 ml HCl-gesättigtem Essigsäureethylester versetzt. Nach 30 min wurde das Eisbad entfernt und 4 h bei RT weitergerührt, wobei eine Trübung der Lösung auftrat. Der farblose Feststoff wurde unter N<sub>2</sub> abfiltriert und nach Umkristallisation (Essigester/PE) im ÖV getrocknet.



**C<sub>12</sub>H<sub>15</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (302.7)**

**Ausbeute:** 64.3 mg (0.21 mmol; 85%)

**PI-DCIMS (NH<sub>3</sub>):** m/z (%) = 267.3, [MH-HCl] (100).

**<sup>1</sup>H-NMR** (250 MHz, D<sub>2</sub>O, 24°C, TMS): δ [ppm] = 2.70/2.82 (AA'BB'-System, 4H, 2CH<sub>2</sub>), 3.99 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 5.16 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 7.48/8.13 (m, 4H, 4CH, aromatisch).

**Elementaranalyse:** [%] ber. C 47.6, H 5.0, N 9.3;

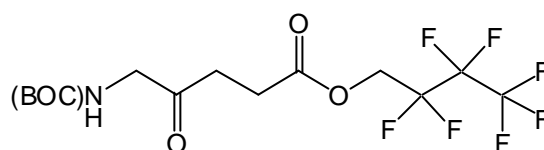
[%] gef. C 46.9, H 5.3, N 8.9.

## 7.9 Synthese fluorierter 5-Aminolävulinsäurealkylester

### 7.9.1 BOC-5-Aminolävulinsäure-1H,1H-heptafluorbutylester

Analog zu AAV 3 wurden zu einer Lösung von 300 mg (1.3 mmol) N-BOC-5-Aminolävulinsäure, 120 mg (1.0 mmol) 4-Dimethylaminopyridin (DMAP) und 300 mg (1.5 mmol) 1H,1H-Heptafluorbutanol in 15 ml trockenem CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> unter Eiskühlung 257.4 mg (1.6 mmol) EDC zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde 2 h bei 0°C und anschließend 2 d bei RT gerührt. Nach Abziehen des LM wurde der Rückstand in einer Mischung aus 100 ml Essigester und 20 ml H<sub>2</sub>O aufgenommen. Zum Entfernen des wasserlöslichen Kupplungsreagens wurde die organische Phase je zweimal mit 30 ml gesättigter NaHCO<sub>3</sub>-Lösung und 20 ml H<sub>2</sub>O extrahiert. Nach Trocknung über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> und Abziehen des LM wurde das Produkt säulenchromatographisch (SiO<sub>2</sub>, MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>: 40/1) gereinigt und als farbloser Feststoff isoliert.

**C<sub>14</sub>H<sub>18</sub>F<sub>7</sub>NO<sub>5</sub> (413.3)**



**Ausbeute:** 362 mg (0.88 mmol; 67.7%)

**PI-DCIMS (NH<sub>3</sub>):** m/z (%) = 431.3, [M+NH<sub>4</sub>] (51.8); 375.2, [M+NH<sub>4</sub>-C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>] (100).

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 24°C, TMS): δ [ppm] = 1.45 (s, 9H, BOC), 2.70-2.80 (AA'BB'-System, 4H, 2CH<sub>2</sub>), 4.10 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 4.59 (t, <sup>3</sup>J(H-F) = 13.5 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 5.18 (breites s, 1H, NH).

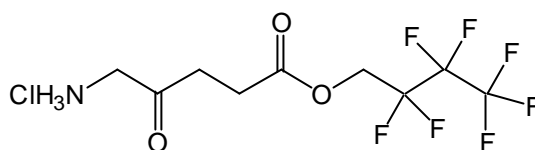
**Elementaranalyse:** [%] ber. C 36.2, H 3.2, N 2.5;

[%] gef. C 35.9, H 3.1, N 2.4.

### 7.9.2 5-Aminolävulinsäure-1H,1H-heptafluorbutylester-hydrochlorid 17

Analog zu AAV 5 wurden 119.3 mg (0.25 mmol) BOC-5-Aminolävulinsäure-1H,1H-heptafluorbutylester unter Eiskühlung in 5 ml getrocknetem Essigsäureethylester gelöst und mit 5 ml HCl-gesättigtem Essigsäureethylester versetzt. Nach 30 min wurde das Eisbad entfernt und 5 h bei RT weitergerührt. Nach vollständiger Entschützung (DC-Kontrolle, Ninhydrinlösung) wurde die Lösung eingeeengt, was zur Fällung des in Essigester schwerlöslichen Hydrochlorids führte. Der farblose Niederschlag wurde unter N<sub>2</sub> abfiltriert.

**C<sub>10</sub>H<sub>12</sub>ClF<sub>8</sub>NO<sub>3</sub> (349.6)**



**Ausbeute:** 72 mg (0.21 mmol; 84%)

**PI-DCIMS (NH<sub>3</sub>):** m/z (%) = 314.2, [MH-HCl] (100).

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, D<sub>2</sub>O, 24°C, TMS): δ [ppm] = 2.73/2.85 (AA'BB'-System, 4H, 2CH<sub>2</sub>), 4.10 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 4.57-4.68 (m, 2H, CH<sub>2</sub>).

**Elementaranalyse:** [%] ber. C 34.3, H 3.4, N 4.0;

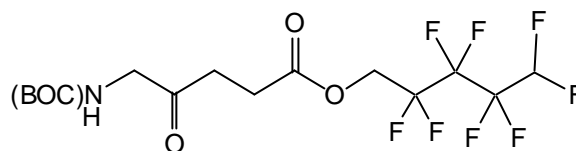
[%] gef. C 35.0, H 4.0, N 3.8.

### 7.9.3 BOC-5-Aminolävulinsäure-1H,1H,5H-octafluorpentylester

In Anlehnung an AAV 3 wurden zu einer Lösung von 300 mg (1.3 mmol) N-BOC-5-Aminolävulinsäure, 120 mg (1.0 mmol) 4-Dimethylaminopyridin (DMAP) und 348.1 mg (1.5 mmol) 1H,1H,5H-Octafluorpentanol in 15 ml trockenem CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> unter Eiskühlung 257.4 mg (1.6 mmol) EDC zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde 2 h bei 0°C und anschließend 2 d bei RT gerührt. Nach Abziehen des LM wurde der Rückstand in einer Mischung aus 100 ml Essigester und 20 ml H<sub>2</sub>O aufgenommen. Zum

Entfernen des wasserlöslichen Kupplungsreagens wurde die organische Phase je zweimal mit 30 ml gesättigter  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung und 20 ml  $\text{H}_2\text{O}$  extrahiert. Nach Trocknung über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  und Abziehen des LM wurde das Produkt säulenchromatographisch ( $\text{SiO}_2$ ,  $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ : 40/1) gereinigt und als farbloser Feststoff isoliert.

**$\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{F}_8\text{NO}_5$  (445.3)**



**Ausbeute:** 346 mg (0.78 mmol; 59.8%)

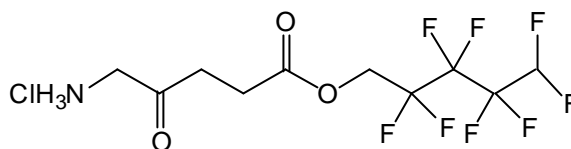
**PI-DCIMS ( $\text{NH}_3$ ):**  $m/z$  (%) = 463.3,  $[\text{M}+\text{NH}_4]$  (48.8), 407.3,  $[\text{M}+\text{NH}_4-\text{C}_4\text{H}_8]$  (100).

**$^1\text{H-NMR}$**  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $24^\circ\text{C}$ , TMS):  $\delta$  [ppm] = 1.45 (s, 9H, BOC), 2.77 (m, 4H,  $2\text{CH}_2$ ), 4.10 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 4.57-4.68 (t,  $^3\text{J}(\text{H-F}) = 13.7$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 5.16 (breites s, 1H, NH), 5.76-6.30 (tt,  $^2\text{J}(\text{H-F}) = 51.9$  Hz,  $^3\text{J}(\text{H-F}) = 5.4$  Hz, 1H, CH).

**Elementaranalyse:** [%] ber. C 40.5, H 4.3, N 3.2;  
[%] gef. C 40.0, H 4.3, N 3.5.

#### 7.9.4 5-Aminolävulinsäure-1H,1H,5H-octafluorpentylester-hydrochlorid 18

Wie in AAV 5 beschrieben, wurden 111.3 mg (0.25 mmol) BOC-5-Aminolävulinsäure-1H,1H,5H-octafluorpentylester unter Eiskühlung in 5 ml getrocknetem Essigsäureethylester gelöst und mit 5 ml HCl-gesättigtem Essigsäureethylester versetzt. Nach 30 min wurde das Eisbad entfernt und 4 h bei RT weitergerührt, wobei eine Trübung der Lösung auftrat. Der farblose Niederschlag wurde unter  $\text{N}_2$  abfiltriert und nach Umkristallisation (Essigester/PE) im ÖV getrocknet.

**C<sub>10</sub>H<sub>12</sub>ClF<sub>8</sub>NO<sub>3</sub> (381.7)****Ausbeute:** 72 mg (0.19 mmol; 75.5%)**PI-DCIMS (NH<sub>3</sub>):** m/z (%) = 346.3, [MH-HCl] (100).

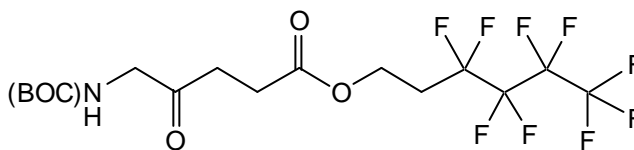
**<sup>1</sup>H-NMR** (250 MHz, D<sub>2</sub>O, 24°C, TMS): δ [ppm] = 2.85/2.90 (AA'BB'-System, 4H, 2CH<sub>2</sub>), 4.10 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 4.57-4.68 (t, <sup>3</sup>J(H-F) = 13.7 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 6.13-6.67 (tt, <sup>2</sup>J(H-F) = 51.1 Hz, <sup>3</sup>J(H-F) = 5.5 Hz, 1H, CH).

**Elementaranalyse:** [%] ber. C 31.5, H 3.2, N 3.7;

[%] gef. C 31.2, H 3.2, N 3.9.

### 7.9.5 BOC-5-Aminolävulinsäure-1H,1H,2H,2H-nonafluorhexylester

Analog zu AAV 3 wurden zu einer Lösung von 300 mg (1.3 mmol) BOC-5-Aminolävulinsäure, 120 mg (1.0 mmol) 4-Dimethylaminopyridin (DMAP) und 369.2 mg (1.5 mmol) 1H,1H,2H,2H-Nonafluorhexanol in 15 ml trockenem CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> unter Eiskühlung 257.4 mg (1.6 mmol) EDC zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde 2 h bei 0°C und anschließend 2 d bei RT gerührt. Nach Abziehen des LM wurde der Rückstand in einer Mischung aus 100 ml Essigester und 20 ml H<sub>2</sub>O aufgenommen. Zum Entfernen des wasserlöslichen Kupplungsreagens wurde die organische Phase je zweimal mit 30 ml gesättigter NaHCO<sub>3</sub>-Lösung und 20 ml H<sub>2</sub>O extrahiert. Nach Trocknung über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> und Abziehen des LM wurde das Produkt säulenchromatographisch (SiO<sub>2</sub>, MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>: 40/1) gereinigt und als farbloser Feststoff isoliert.

**C<sub>16</sub>H<sub>20</sub>F<sub>9</sub>NO<sub>5</sub> (477.3)****Ausbeute:** 352 mg (0.74 mmol; 56.7%)

**PI-DCIMS (NH<sub>3</sub>):** m/z (%) = 495.3, [M+NH<sub>4</sub>] (59.7); 439.3, [M+NH<sub>4</sub>-C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>] (100).

**<sup>1</sup>H-NMR** (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 24°C, TMS): δ [ppm] = 1.45 (s, 9H, BOC), 2.35-2.60 (tt, <sup>3</sup>J(H-H) = 6.5 Hz, <sup>3</sup>J(H-F) = 18.3 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.70-2.80 (AA'BB'-System, 4H, 2CH<sub>2</sub>), 4.10 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 4.38 (t, <sup>3</sup>J(H-H) = 6.5 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 5.17 (breites s, 1H, NH).

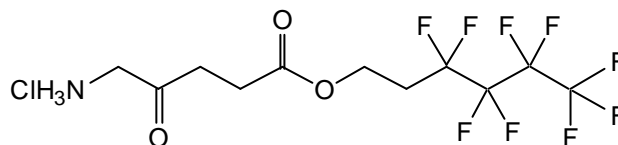
**Elementaranalyse:** [%] ber. C 40.3, H 4.2, N 2.9;

[%] gef. C 39.7, H 3.7, N 2.4.

### 7.9.6 5-Aminolävulinsäure-1H,1H,2H,2H-nonafluorhexylester-hydrochlorid 19

Analog zu AAV 5 wurden 119.3 mg (0.25 mmol) BOC-5-Aminolävulinsäure-1H,1H,2H,2H-nonafluorhexylester unter Eiskühlung in 5 ml getrocknetem Essigsäureethylester gelöst und mit 5 ml HCl-gesättigtem Essigsäureethylester versetzt. Nach 30 min wurde das Eisbad entfernt und 5 h bei RT weitergerührt. Nach vollständiger Entschützung (DC-Kontrolle, Ninhydrinlösung) wurde die Lösung eingeeengt, was zur Fällung des in Essigester schwerlöslichen Hydrochlorids führte. Der Niederschlag wurde unter N<sub>2</sub> abfiltriert und nach Umkristallisation (Essigester/PE) wurde der farblose Feststoff im ÖV getrocknet.

**C<sub>11</sub>H<sub>13</sub>ClF<sub>9</sub>NO<sub>3</sub> (413.7)**



**Ausbeute:** 84 mg (0.2 mmol; 81.2%)

**PI-DCIMS (NH<sub>3</sub>):** m/z (%) = 378.3, [MH-HCl] (100).

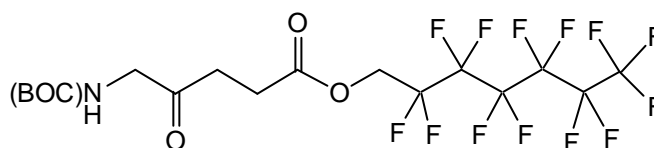
**$^1\text{H-NMR}$**  (250 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ,  $24^\circ\text{C}$ , TMS):  $\delta$  [ppm] = 2.40-2.57 (tt,  $^3\text{J}(\text{H-H}) = 6.1$  Hz,  $^3\text{J}(\text{H-F}) = 19.4$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 2.62/2.79 (AA'BB'-System, 4H,  $2\text{CH}_2$ ), 4.00 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 4.34 (t,  $^3\text{J}(\text{H-H}) = 6.1$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ ).

**Elementaranalyse:** [%] ber. C 31.9, H 3.2, N 3.4;  
[%] gef. C 31.1, H 3.3, N 3.4.

### 7.9.7 BOC-5-Aminolävulinsäure-1H,1H-tridecafluorheptylester

Analog zu AAV 3 wurden zu einer Lösung von 300 mg (1.3 mmol) N-BOC-Aminolävulinsäure, 120 mg (1.0 mmol) 4-Dimethylaminopyridin (DMAP) und 525 mg (1.5 mmol) 1H,1H-Tridecafluorheptanol in 15 ml trockenem  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  unter Eiskühlung 257.4 mg (1.6 mmol) EDC zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde 2 h bei  $0^\circ\text{C}$  und anschließend 2 d bei RT gerührt. Nach Abziehen des LM wurde der Rückstand in einer Mischung aus 100 ml Essigester und 20 ml  $\text{H}_2\text{O}$  aufgenommen. Zum Entfernen des wasserlöslichen Kupplungsreagens wurde die organische Phase je zweimal mit 30 ml gesättigter  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung und 20 ml  $\text{H}_2\text{O}$  extrahiert. Nach Trocknung über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  und Abziehen des LM wurde das Produkt säulenchromatographisch ( $\text{SiO}_2$ ,  $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ : 40/1) gereinigt und als farbloser Feststoff isoliert.

**$\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{F}_{13}\text{NO}_5$  (563.3)**



**Ausbeute:** 406 mg (0.72 mmol; 55%)

**PI-DCIMS ( $\text{NH}_3$ ):**  $m/z$  (%) = 581.4,  $[\text{M}+\text{NH}_4]$  (42.9); 525.3,  $[\text{M}+\text{NH}_4-\text{C}_4\text{H}_8]$  (100).

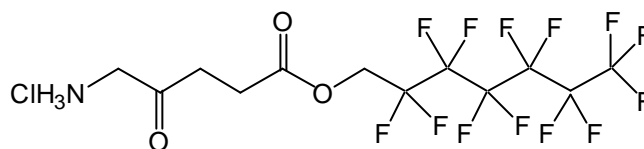
**$^1\text{H-NMR}$**  (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $24^\circ\text{C}$ , TMS):  $\delta$  [ppm] = 1.45 (s, 9H, BOC), 2.77 (m, 4H,  $2\text{CH}_2$ ), 4.06 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 4.58 (t,  $^3\text{J}(\text{H-F}) = 13.7$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 5.17 (breites s, 1H, NH).



**Elementaranalyse:** [%] ber. C 40.7, H 4.4, N 3.4;  
[%] gef. C 41.0, H 4.3, N 3.5.

### 7.9.8 5-Aminolävulinsäure-1H,1H-tridecafluorheptylester-hydrochlorid 20

Analog zu AAV 5 wurden 119.3 mg (0.25 mmol) BOC-5-Aminolävulinsäure-1H,1H-nonafluorhexylester unter Eiskühlung in 5ml getrocknetem Essigsäureethylester gelöst und mit 5ml HCl-gesättigtem Essigsäureethylester versetzt. Nach 30 min wurde das Eisbad entfernt und 5 h bei RT weitergerührt. Nach vollständiger Entschützung (DC-Kontrolle, Ninhydrinlösung) wurde die Lösung eingeeengt, was zur Fällung des in Essigester schwerlöslichen Hydrochlorids führte. Der Niederschlag wurde unter N<sub>2</sub> abfiltriert. Nach Umkristallisation (Essigester/PE) wurde der farblose Feststoff im ÖV getrocknet.



**C<sub>12</sub>H<sub>11</sub>ClF<sub>19</sub>NO<sub>3</sub> (499.3)**

**Ausbeute:** 99 mg (0.20 mmol; 80%)

**PI-DCIMS (NH<sub>3</sub>):** m/z (%) = 464.2, [MH-HCl] (100).

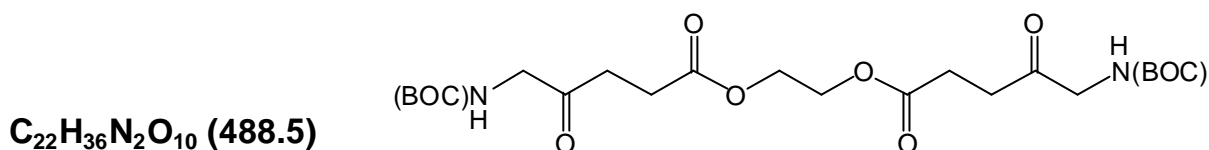
**<sup>1</sup>H-NMR** (250 MHz, D<sub>2</sub>O, 24°C, TMS): δ [ppm] = 2.71/2.84 (AA'BB'-System, 4H, 2CH<sub>2</sub>), 4.00 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 4.76 (m, 2H, CH<sub>2</sub>).

**Elementaranalyse:** [%] ber. C 28.9, H 2.2, N 2.8;  
[%] gef. C 29.1, H 2.3, N 2.9.

## 7.10 Synthese von 5-Aminolävulinsäureoligoestern

### 7.10.1 Di-BOC-bis-5-aminolävulinsäureethylenglykoldiester

Analog zu AAV 3 wurden zu einer Lösung von 300 mg (1.3 mmol) BOC-5-Aminolävulinsäure, 120 mg (1.0 mmol) 4-Dimethylaminopyridin (DMAP) und 93 mg (1.5 mmol) Glykol in 15 ml trockenem  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  unter Eiskühlung 257.4 mg (1.6 mmol) EDC zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde 2 h bei  $0^\circ\text{C}$  und anschließend 2 d bei RT gerührt. Nach Abziehen des LM wurde der Rückstand in einer Mischung aus 100 ml Essigester und 20 ml  $\text{H}_2\text{O}$  aufgenommen. Zum Entfernen des wasserlöslichen Kupplungsreagens wurde die organische Phase je zweimal mit 30 ml gesättigter  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung und 20 ml  $\text{H}_2\text{O}$  extrahiert. Nach Trocknung über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  und Abziehen des LM wurde das Produkt säulenchromatographisch ( $\text{SiO}_2$ ,  $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ : 40/1) gereinigt und als farbloser Feststoff isoliert.



**Ausbeute:** 336.3 mg (0.69 mmol; 52.9%)

**PI-DCIMS ( $\text{NH}_3$ ):**  $m/z$  (%) = 506.6,  $[\text{M}+\text{NH}_4]$  (89.6); 389.4,  $[\text{MH}-\text{BOC}]$  (100).

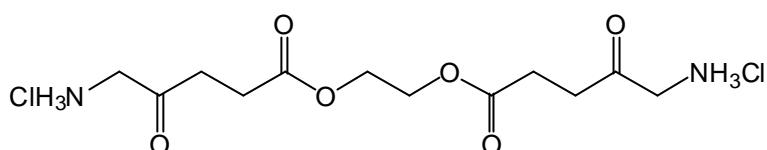
**$^1\text{H}$ -NMR** (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $24^\circ\text{C}$ , TMS):  $\delta$  [ppm] = 1.45 (s, 18H, BOC), 2.63/2.81 (AA'BB'-System, 8H, 4 $\text{CH}_2$ ), 4.1 (m, 4H, 2 $\text{CH}_2$ ), 4.27 (s, 4H, 2 $\text{CH}_2$ ), 5.28 (breites s, 2H, 2NH).

**Elementaranalyse:** [%] ber. C 54.1, H 7.4, N 5.7;  
[%] gef. C 53.0, H 7.4, N 4.9.

### 7.10.2 Bis-5-aminolävulinsäureethylenglykoldiester-dihydrochlorid 22

Analog zu AAV 5 wurden 122.1 mg (0.25 mmol) Di-BOC-bis-5-aminolävulinsäureethylenglykoldiester unter Eiskühlung in 5 ml getrocknetem Essigsäureethylester gelöst und mit 5 ml HCl-gesättigtem Essigsäureethylester versetzt. Nach 30 min wurde das Eisbad entfernt und 5 h bei RT weitergerührt. Nach vollständiger Entschützung (DC-Kontrolle, Ninhydrinlösung) wurde die Lösung eingeeengt, was zur Fällung des in Essigester schwerlöslichen Hydrochlorids führte. Der farblose, hygroskopische Niederschlag wurde unter N<sub>2</sub> abfiltriert und im ÖV getrocknet.

**C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub> (361.2)**



**Ausbeute:** 79.3 mg (0.22 mmol; 87.8%)

**ESI (CH<sub>3</sub>OH, 1% HAc):** m/z (%) = 288.9, [MH-2HCl] (100).

**<sup>1</sup>H-NMR** (250 MHz, D<sub>2</sub>O, 24°C, TMS): δ [ppm] = 2.62/2.81 (AA'BB'-System, 8H, 4CH<sub>2</sub>), 4.15 (s, 4H, 2CH<sub>2</sub>), 4.23 (s, 4H, 2CH<sub>2</sub>).

**C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>·H<sub>2</sub>O (379.2)**

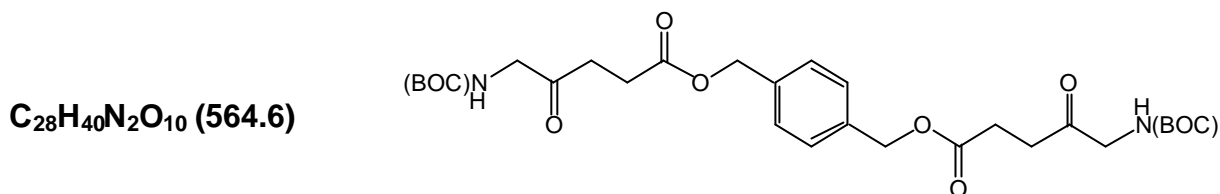
**Elementaranalyse:** [%] ber. C 38.0, H 6.1, N 7.4;

[%] gef. C 38.2, H 6.3, N 7.2.

### 7.10.3 Di-BOC-bis-5-aminolävulinsäure-1,4-dibenzyl-diester

Analog zu AAV 3 wurden zu einer Lösung von 300 mg (1.3 mmol) BOC-5-Aminolävulinsäure, 120 mg (1.0 mmol) 4-Dimethylaminopyridin (DMAP) und 207 mg (1.5 mmol) 1,4-Dibenzylalkohol in 15 ml trockenem CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> unter Eiskühlung 257.4 mg (1.6 mmol) EDC zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde 2 h bei 0°C und

anschließend 2 d bei RT gerührt. Nach Abziehen des LM wurde der Rückstand in einer Mischung aus 100 ml Essigester und 20 ml H<sub>2</sub>O aufgenommen. Zum Entfernen des wasserlöslichen Kupplungsreagens wurde die organische Phase je zweimal mit 30 ml gesättigter NaHCO<sub>3</sub>-Lösung und 20 ml H<sub>2</sub>O extrahiert. Nach Trocknung über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> und Abziehen des LM wurde das Produkt säulenchromatographisch (SiO<sub>2</sub>, MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>: 40/1) gereinigt und als farbloser Feststoff isoliert.



**Ausbeute:** 376.3 mg (0.67 mmol; 51.3%)

**PI-DCIMS (NH<sub>3</sub>):** m/z (%) = 582.6, [M+NH<sub>4</sub>] (100).

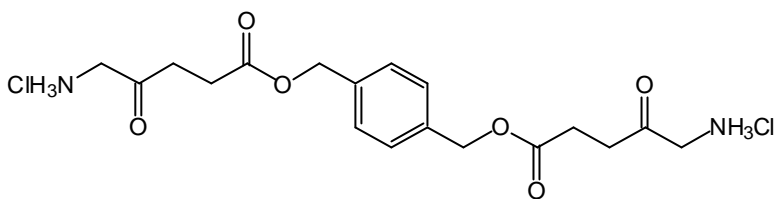
**<sup>1</sup>H-NMR** (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 24°C, TMS): δ [ppm] = 1.45 (s, 18H, BOC), 2.64-2.79 (m, 8H, 4CH<sub>2</sub>), 4.07 (m, 4H, 2CH<sub>2</sub>), 5.11 (s, 4H, 2CH<sub>2</sub>), 5.19 (breites s, 2H, 2NH), 7.33 (s, 4H, 4CH, aromatisch).

**Elementaranalyse:** [%] ber. C 59.6, H 7.1, N 5.0;

[%] gef. C 59.5, H 7.2, N 4.8.

#### 7.10.4 Bis-5-aminolävulinsäure-1,4-dibenzyl-diester-dihydrochlorid 23

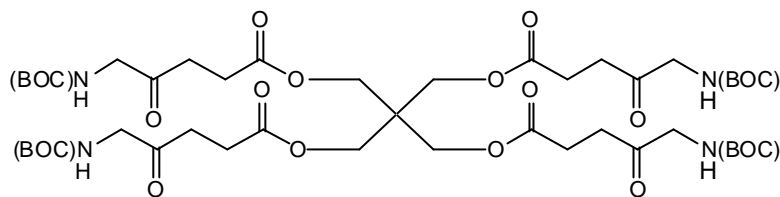
Analog zu AAV 5 wurden 141.2 mg (0.25 mmol) Di-BOC-bis-5-aminolävulinsäure-1,4-dibenzylester unter Eiskühlung in 5 ml getrocknetem Essigsäureethylester gelöst und mit 5 ml HCl-gesättigtem Essigsäureethylester versetzt. Nach 30 min wurde das Eisbad entfernt und 3 h bei RT weitergerührt. Das in Essigester schwerlösliche Dihydrochlorid fiel in Form eines farblosen, hygroskopischen Pulvers aus, wurde unter N<sub>2</sub> abfiltriert und im ÖV getrocknet.

**C<sub>18</sub>H<sub>26</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub> (437.3)****Ausbeute:** 95 mg (0.22 mmol; 87.2%)**ESI (CH<sub>3</sub>OH, 1% HAc):** m/z (%) = 365.0, [MH-2HCl] (100).**<sup>1</sup>H-NMR** (250 MHz, D<sub>2</sub>O, 24°C, TMS): δ [ppm] = 2.64/2.81 (AA'BB'-System, 8H, 4CH<sub>2</sub>), 3.98 (s, 4H, 2CH<sub>2</sub>), 5.05 (s, 4H, 2CH<sub>2</sub>), 7.32 (s, 4H, 4CH, aromatisch).**C<sub>18</sub>H<sub>26</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>·H<sub>2</sub>O (455.3)****Elementaranalyse:** [%] ber. C 47.4, H 6.1, N 6.1;

[%] gef. C 47.2, H 5.8, N 5.8.

### 7.10.5 Tetra-BOC-tetrakis-5-aminolävulinsäurepentaerythrittetraester

Analog zu AAV 3 wurden zu einer Lösung von 300 mg (1.3 mmol) BOC-5-Aminolävulinsäure, 120 mg (1.0 mmol) 4-Dimethylaminopyridin (DMAP) und 204 mg (1.5 mmol) Pentaerythrit in 15 ml trockenem CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> unter Eiskühlung 257.4 mg (1.6 mmol) EDC zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde 2 h bei 0°C und anschließend 2 d bei RT gerührt. Nach Abziehen des LM wurde der Rückstand in einer Mischung aus 100 ml Essigester und 20 ml H<sub>2</sub>O aufgenommen. Zum Entfernen des wasserlöslichen Kupplungsreagens wurde die organische Phase je zweimal mit 30 ml gesättigter NaHCO<sub>3</sub>-Lösung und 20 ml H<sub>2</sub>O extrahiert. Nach Trocknung über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> und Abziehen des LM wurde das Produkt säulenchromatographisch (SiO<sub>2</sub>, MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>: 40/1) gereinigt und als farbloser Feststoff isoliert.

**C<sub>45</sub>H<sub>72</sub>N<sub>4</sub>O<sub>20</sub> (989.1)****Ausbeute:**

717.5 mg (0.73 mmol; 55.8%)

**ESI (CH<sub>3</sub>OH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 1% HAc):** m/z (%) = 1006.6, [M+NH<sub>4</sub>] (40); 1011.5, [M+Na] (100).

**<sup>1</sup>H-NMR** (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 24°C, TMS): δ [ppm] = 1.45 (s, 36H, BOC), 2.56/2.82 (AA'BB'-System, 16H, 8CH<sub>2</sub>), 3.89-4.18 (m, 16H, 8CH<sub>2</sub>), 5.37 (breites s, 4H, NH).

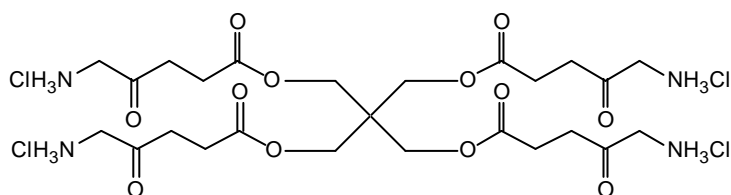
**Elementaranalyse:**

[%] ber. C 54.6, H 7.3, N 5.6;

[%] gef. C 53.6, H 7.3, N 5.2.

#### 7.10.6 Tetrakis-5-aminolävulinsäure-pentaerythrityltetraester-tetrahydrochlorid 24

Analog zu AAV 5 wurden 247.3 mg (0.25 mmol) Tetra-BOC-tetrakis-5-aminolävulinsäurepentaerythrityltetraester unter Eiskühlung in 5 ml getrocknetem Essigsäureethylester gelöst und mit 5 ml HCl-gesättigtem Essigsäureethylester versetzt. Nach 30 min wurde das Eisbad entfernt und 5 h bei RT weitergerührt. Nach vollständiger Entschützung (DC-Kontrolle, Ninhydrinlösung) wurde die Lösung eingeeengt, was zur Fällung des in Essigester schwerlöslichen Hydrochlorids führte. Der farblose, hygroscopische Feststoff wurde unter N<sub>2</sub> abfiltriert und im ÖV getrocknet.

**C<sub>25</sub>H<sub>44</sub>Cl<sub>4</sub>N<sub>4</sub>O<sub>12</sub> (734.5)****Ausbeute:**

149.1 mg (0.20 mmol; 81.2%)

**ESI (CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O, 1% HAc):** m/z (%) = 589.2, [MH-4HCl] (15); 295.2, [ $\frac{1}{2}$ (M-4HCl)H] (100).

**<sup>1</sup>H-NMR** (250 MHz, D<sub>2</sub>O, 24°C, TMS): δ [ppm] = 2.65/2.83 (AA`BB`-System, 16H, 8CH<sub>2</sub>), 3.97-4.15 (m, 16H, 8CH<sub>2</sub>).

**C<sub>25</sub>H<sub>44</sub>Cl<sub>4</sub>N<sub>4</sub>O<sub>12</sub>·H<sub>2</sub>O (752.5)**

**Elementaranalyse:** [%] ber. C 39.9, H 6.1, N 7.4;  
[%] gef. C 39.9, H 6.3, N 6.9.

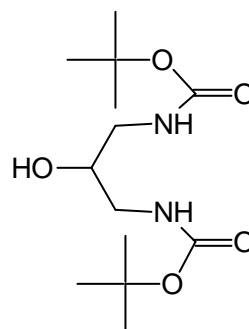
## 7.11 Synthese von 5-Aminolävulinsäurediaminopropylestern

### 7.11.1 1,3-Di-BOC-diamino-2-propanol

Zu einer Lösung von 2 g (22 mmol) 1,3-Diamino-2-propanol in 20 ml trockenem MeOH wurde langsam unter Eiskühlung eine Lösung von 9.6 g (9.4 ml, 44 mmol) BOC-Anhydrid in 10 ml MeOH zugetropft. Nach 2 h Rühren bei RT wurde das LM abgezogen und es wurde aus Ether/PE umkristallisiert. Die BOC-geschützte Verbindung wurde als weißer Feststoff isoliert.

**C<sub>13</sub>H<sub>26</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (290.4)**

**Ausbeute:** 5.3 g (15.4 mmol; 83%)



**PI-DCIMS (NH<sub>3</sub>):** m/z (%) = 291.4, [MH] (100).

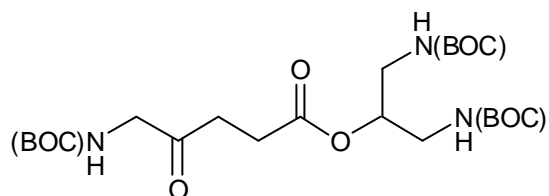
**<sup>1</sup>H-NMR** (250 MHz, DMSO, 24°C, TMS): δ [ppm] = 1.41 (s, BOC, 18H), 3.31 (m, 4H, 2CH<sub>2</sub>), 3.40 (m, 1H, CH), 4.75 (d, 1H, OH), 6.60 (breites s, 2H, NH).

**Elementaranalyse:** [%] ber. C 53.8, H 9.0, N 9.7;  
[%] gef. C 53.9, H 9.2, N 9.6.

### 7.11.2 BOC-5-Aminolävulinsäure-1,3-di-BOC-diamino-2-propylester

Analog zu AAV 3 wurden zu einer Lösung von 300 mg (1.3 mmol) BOC-5-Aminolävulinsäure, 120 mg (1.0 mmol) 4-Dimethylaminopyridin (DMAP) und 435.5 mg (1.5 mmol) 1,3-Di-BOC-diamino-2-propanol in 15 ml trockenem  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  unter Eiskühlung 257.4 mg (1.6 mmol) EDC zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde 2 h bei  $0^\circ\text{C}$  und anschließend 2 d bei RT gerührt. Nach Abziehen des LM wurde der Rückstand in einer Mischung aus 100 ml Essigester und 20 ml  $\text{H}_2\text{O}$  aufgenommen. Zum Entfernen des wasserlöslichen Kupplungsreagens wurde die organische Phase je zweimal mit 30 ml gesättigter  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung und 20 ml  $\text{H}_2\text{O}$  extrahiert. Nach Trocknung über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  und Abziehen des LM wurde der Ester säulenchromatographisch ( $\text{SiO}_2$ ,  $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ : 40/1) gereinigt und als farbloser Feststoff isoliert.

**$\text{C}_{23}\text{H}_{41}\text{N}_3\text{O}_9$  (503.6)**



**Ausbeute:** 449 mg (0.89 mmol; 68.6%)

**PI-DCIMS ( $\text{NH}_3$ ):**  $m/z$  (%) = 521.5,  $[\text{M}+\text{NH}_4]$  (100).

**$^1\text{H-NMR}$**  (250 MHz,  $\text{DMSO-D}_6$ ,  $24^\circ\text{C}$ , TMS):  $\delta$  [ppm] = 1.45 (s, 27H, 3BOC), 2.64/2.76 (AA'BB'-System, 4H, 2 $\text{CH}_2$ ), 3.30 (m, 4H, 2  $\text{CH}_2$ ), 4.06 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 4.14 (t, 1H, CH), 4.8/5.1/5.2 (breites s, 3H, 3NH).

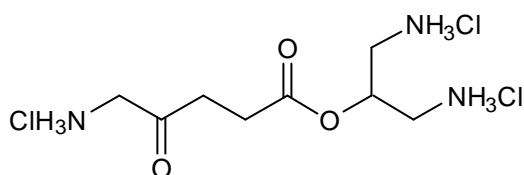
**Elementaranalyse:** [%] ber. C 54.9, H 8.2, N 8.3;  
[%] gef. C 54.6, H 8.4, N 7.6.



### 7.11.3 5-Aminolävulinsäure-1,3-diamino-2-propylester-trihydrochlorid 25

Analog zu AAV 5 wurden 125.9 mg (0,25 mmol) BOC-5-Aminolävulinsäure-1,3-di-BOC-diamino-2-propylester unter Eiskühlung in 5 ml getrocknetem Essigsäureethylester gelöst und mit 5 ml HCl-gesättigtem Essigsäureethylester versetzt. Nach 30 min wurde das Eisbad entfernt und 5 h bei RT weitergerührt. Nach vollständiger Entschüttung (DC-Kontrolle, Ninhydrinlösung) wurde die Lösung eingeeengt, was zur Fällung des in Essigester schwerlöslichen Hydrochlorids führte. Der farblose Niederschlag wurde unter N<sub>2</sub> abfiltriert und im ÖV getrocknet.

**C<sub>8</sub>H<sub>20</sub>Cl<sub>3</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub> (312.6)**



**Ausbeute:** 70.8 mg (0.23 mmol; 90.6%)

**ESI:** m/z (%) = 203.8, [MH-3HCl] (100).

**<sup>1</sup>H-NMR** (250 MHz, D<sub>2</sub>O, 24°C, TMS): δ [ppm] = 2.72/2.87 (AA'BB'-System, 4H, 2CH<sub>2</sub>), 3.22-3.28 (m, 4H, 2CH<sub>2</sub>), 3.98 (m, 1H, CH), 4.02 (s, 2H, CH<sub>2</sub>).

**Elementaranalyse:** [%] ber. C 30.7, H 6.5, N 13.4;

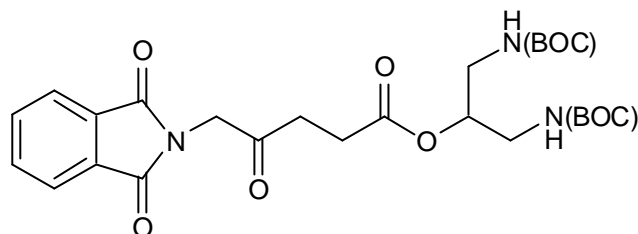
[%] gef. C 31.1, H 7.0, N 12.7.

### 7.11.4 5-Phthalimidolävulinsäure-1,3-di-BOC-diamino-2-propylester

In Anlehnung an AAV 3 wurden zu einer Lösung von 340 mg (1.3 mmol) 5-Aminolävulinsäurephthalimid, 120 mg (1.0 mmol) 4-Dimethylaminopyridin (DMAP) und 435.5 mg (1.5 mmol) 1,3-Di-BOC-diamino-2-propanol in 15 ml trockenem CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> unter Eiskühlung 257.4 mg (1.6 mmol) EDC zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde 2 h bei 0°C und anschließend 2 d bei RT gerührt. Nach Abziehen des LM wurde der Rückstand in einer Mischung aus 100 ml Essigester und 20 ml H<sub>2</sub>O aufgenommen.

Zum Entfernen des wasserlöslichen Kupplungsreagens wurde die organische Phase je zweimal mit 30 ml gesättigter  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung und 20 ml  $\text{H}_2\text{O}$  extrahiert. Nach Trocknung über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  und Abziehen des LM wurde das Produkt säulenchromatographisch ( $\text{SiO}_2$ ,  $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ : 40/1) gereinigt und als farbloser Feststoff isoliert.

**$\text{C}_{26}\text{H}_{35}\text{N}_3\text{O}_9$  (533.6)**



**Ausbeute:**

458 mg (0.86 mmol; 66%)

**ESI ( $\text{CH}_3\text{OH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 1%  $\text{HAc}$ ):**  $m/z$  (%) = 551.2,  $[\text{M}+\text{NH}_4]$  (100).

**$^1\text{H-NMR}$**  (250 MHz,  $\text{DMSO-D}_6$ ,  $24^\circ\text{C}$ , TMS):  $\delta$  [ppm] = 1.42 (s, 18H, 2BOC), 2.65/2.88 (AA'BB'-System, 4H,  $2\text{CH}_2$ ), 3.31 (t,  $^3J(\text{H-H}) = 5.8$  Hz, 4H,  $2\text{CH}_2$ ), 4.55 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 4.84 (m, 1H, CH), 5.00-5.20 (s, 2H,  $2\text{NH}$ ), 7.76-7.86 (m, 4H, 4CH, aromatisch).

**Elementaranalyse:**

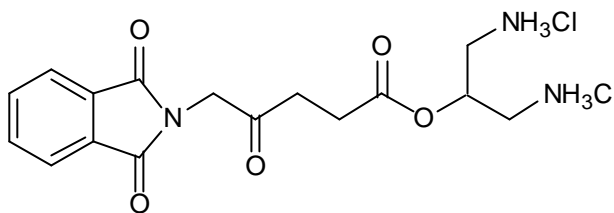
[%] ber. C 58.5, H 6.6, N 7.9;

[%] gef. C 58.7, H 6.9, N 7.5.

#### 7.11.5 Phthalimidolävulinsäure-1,3-diamino-2-propylester-dihydrochlorid 26

Wie in AAV 5 beschrieben, wurden 133.4 mg (0.25 mmol) Phthalimidolävulinsäure-1,3-diamino-2-propylester unter Eiskühlung in 5 ml getrocknetem Essigsäureethylester gelöst und mit 5 ml  $\text{HCl}$ -gesättigtem Essigsäureethylester versetzt. Nach 30 min wurde das Eisbad entfernt und 4 h bei RT weitergerührt, wobei eine Trübung der Lösung auftrat. Der farblose Feststoff wurde unter  $\text{N}_2$  abfiltriert und nach Umkristallisation (Essigester/PE) im ÖV getrocknet.

**C<sub>16</sub>H<sub>21</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub> (406.3)**



**Ausbeute:** 98.6 mg (0.24 mmol; 97%)

**ESI (CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O, 1% HAc):** m/z (%) = 334.0, [MH-2HCl] (100).

**<sup>1</sup>H-NMR** (250 MHz, DMSO-D<sub>6</sub>, 24°C, TMS): δ [ppm] = 2.71/2.96 (AA'BB'-System, 4H, 2CH<sub>2</sub>), 3.15 (d, <sup>3</sup>J(H-H) = 4.36 Hz, 4H, 2CH<sub>2</sub>), 4.65 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 5.17 (m, 1H, CH), 7.91 (m, 4H, 4CH, aromatisch), 8.36 (breites s, 6H, 2NH<sub>3</sub>).

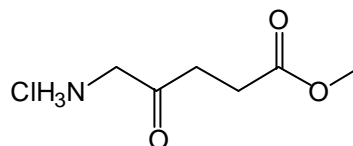
**Elementaranalyse:** [%] ber. C 47.2, H 5.2, N 10.3;  
[%] gef. C 46.7, H 5.5, N 10.0.

## 7.12 Synthese von Diaminosäureamiden mit 5-Aminolävulinsäureestern als Aminkomponente <sup>[50]</sup>

### 7.12.1 5-Aminolävulinsäuremethylester-hydrochlorid 9

Zu 10 ml trockenem Methanol wurden unter Eiskühlung 3 ml (41.4 mmol) frisch destilliertes SOCl<sub>2</sub> langsam zugetropft. Nach 20-minütigem Rühren bei RT wurden portionsweise 300 mg (1.79 mmol) 5-Aminolävulinsäure zugegeben. Anschließend wurde der Ansatz, nach 1 h Behandeln im Ultraschallbad, 45 min auf 60°C erhitzt. Das LM wurde am ÖV abgezogen. Nach Umkristallisation aus MeOH/Ether konnte das Produkt als weißes Pulver erhalten werden.

**C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>NO<sub>3</sub>Cl (181.6)**



**Ausbeute:** 192 mg (1.1 mmol; 61.4%)

**Schmp.:** 123 °C

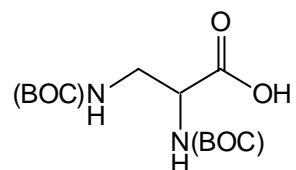
**<sup>1</sup>H-NMR:** (250 MHz, CD<sub>3</sub>OD, 24°C, TMS): δ [ppm] = 2.63/2.84 (AA'BB'-System, 4H, 2CH<sub>2</sub>), 3.65 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 4.0 (s, 2H, CH<sub>2</sub>).

### 7.12.2 Di-BOC-2,3-diaminopropionsäure

*tert*-Butyloxycarbonylazid-Lösung: 3.30 g (25 mmol) *tert*-Butylcarbazat in 17 ml Dioxan und 6 ml Wasser wurden unter Rühren bei 0°C mit 5 ml 5 N Salzsäure versetzt. Anschließend wurde bei 5°C Innentemperatur innerhalb von 10 min eine Lösung von 1.77 g (26.0 mmol) NaNO<sub>2</sub> in 6 ml H<sub>2</sub>O zugegeben. Nach 20 min Rühren bei RT wurde die Azidlösung weiterverarbeitet.

1 g (7.00 mmol) DL-2,3-Diaminopropionsäure-monohydrochlorid wurde in 5 ml Di-oxan, 3 ml H<sub>2</sub>O und 10 ml Triethylamin aufgenommen. Nach 10 min Rühren bei RT wurde die frisch hergestellte *tert*-Butyloxycarbonylazid-Lösung (25 mmol-Ansatz) zugegeben. Die entstandene orangefarbene Lösung wurde 24 h lang bei 50-55°C gerührt. Die Reaktionsmischung wurde, um Reste von *tert*-Butyloxycarbonylazid zu entfernen, fünfmal mit je 100 ml Diethylether extrahiert und die Etherphasen wurden verworfen. Die verbleibende Lösung wurde mit konzentrierter Zitronensäure angesäuert (pH 5) und mit Ether ausgeschüttelt. Nach Trocknung der organischen Phase über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> und Abziehen des LM wurde dreimal aus Diethylether umkristallisiert und das farblose Produkt im ÖV getrocknet.

**C<sub>13</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub> (304.3)**



**Ausbeute:** 1.24g (4.08 mmol; 58%)

**Schmp.:** 155-156°C

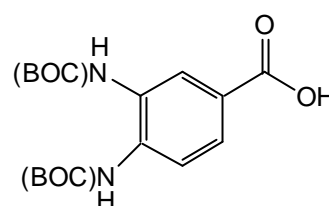
**<sup>1</sup>H-NMR** (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 24°C, TMS): δ [ppm] = 1.46 (s, 18H, 2BOC), 3.51 (d, <sup>3</sup>J(H-H) = 8.8 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 4.25 (t, <sup>3</sup>J(H-H) = 8.8 Hz, 1H, CH), 3.38-6.42 (m, 2H, NH), 8.2 (breites s, 1H, OH).

**Elementaranalyse:** [%] ber. C 51.3, H 7.9, N 9.2;  
[%] gef. C 51.1, H 7.8, N 9.1.

### 7.12.3 3,4-Di-BOC-diaminobenzoesäure

Zu einer Lösung von 0.5 g (3.3 mmol) 3,4-Diaminobenzoesäure in 20 ml trockenem MeOH wurde langsam unter Eiskühlung eine Lösung von 14.4 g (6.6 mmol) BOC-Anhydrid in 20 ml MeOH zugetropft und 24 h bei 40°C gerührt. Nach Abziehen des LM und chromatographischer Aufarbeitung (SiO<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH: 50/1) konnte das Produkt in Form eines farblosen Feststoffs isoliert werden.

**C<sub>17</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub> (352.4)**



**Ausbeute:** 950 mg (1.9 mmol; 58.6%)

**PI-DCIMS (NH<sub>3</sub>):** m/z (%) = 370.4, [M+NH<sub>4</sub>] (100).

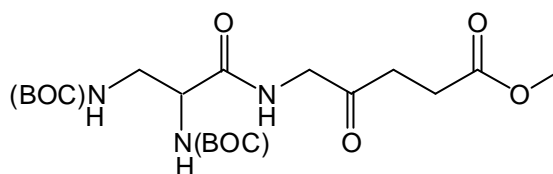
**<sup>1</sup>H-NMR** (250 MHz, DMSO-D<sub>6</sub>, 24°C, TMS): δ [ppm] = 1.47 (s, 18H, 2BOC), 6.68 (d, <sup>3</sup>J(H-H) = 7.4 Hz, 1H, CH, aromatisch), 7.4 (d, <sup>3</sup>J(H-H) = 7.4 Hz, 1H, CH, aromatisch), 7.85 (s, 1H, CH, aromatisch), 12.20 (s, breit, 1H, COOH).

**Elementaranalyse:** [%] ber. C 58.0, H 6.9, N 7.9;  
[%] gef. C 58.9, H 7.1, N 7.6.

#### 7.12.4 2,3-Di-BOC-diaminopropionsäure-N-methyl-5-aminolävulinatylamid

Eine Lösung von 304 mg (1 mmol) Di-BOC-2,3-diaminopropionsäure in 8 ml DMF wurde innerhalb von 45 min durch Zugabe von 0.82 g (6.1 mmol) N-Hydroxybenzotriazol (HOBt) und 1.16g (6.1 mmol) EDC aktiviert. Hierzu wurde eine Lösung von 360 mg (2 mmol) ALA-Methylester in 6 ml DMF innerhalb von 10 min zugetropft und anschließend wurde die Reaktionsmischung mit 0.77 ml (5.5 mmol)  $\text{NEt}_3$  versetzt. Nach 24 h Rühren bei RT wurde das LM im ÖV abgezogen und der Rückstand zweimal mit je 100 ml Essigester extrahiert. Nach zweimaligem Waschen der organischen Phase mit je 75 ml 1M Zitronensäure,  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung (10%) und gesättigter NaCl-Lösung wurde das LM abgezogen. Nach Säulenchromatographischer Aufarbeitung ( $\text{SiO}_2$ , Essigester/PE: 5/1-1/3) wurde das Produkt als gelblicher, harziger Feststoff isoliert.

**$\text{C}_{19}\text{H}_{33}\text{N}_3\text{O}_3$  (431.5)**



**Ausbeute:** 300 mg (0.7 mmol; 70%)

**PI-DCIMS ( $\text{NH}_3$ ):**  $m/z$  (%) = 449.3,  $[\text{M}+\text{NH}_4]$  (100).

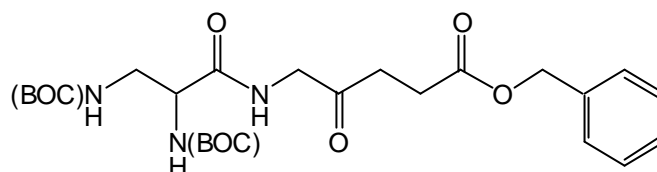
**$^1\text{H}$ -NMR** (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 24°C, TMS):  $\delta$  [ppm] = 1.44 (s, 2BOC, 18H), 2.66/2.73 (AA'BB'-System, 4H, 2 $\text{CH}_2$ ), 3.51 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 3.68 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 4.17 (m, 1H, CH), 4.22 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 5.11/5.71/7.15 (breites s, 3H, NH).

**Elementaranalyse:** [%] ber. C 52.9, H 7.7, N 9.7;  
[%] gef. C 53.0, H 7.7, N 9.5.

### 7.12.5 2,3-Di-BOC-diaminopropionsäure-N-benzyl-5-aminolävulinatylamid

Eine Lösung von 300 mg (0.85 mmol) Di-BOC-2,3-diaminopropionsäure in 8 ml DMF wurde innerhalb von 45 min durch Zugabe von 0.70 g (5.2 mmol) N-Hydroxybenzotriazol (HOBt) und 0.99 g (5.2 mmol) EDC aktiviert. Hierzu wurde eine Lösung von 306 mg (1.7 mmol) ALA-Benzylester in 6 ml DMF innerhalb von 10 min zuge tropft und anschließend wurde die Reaktionsmischung mit 0.65 ml (4.7 mmol)  $\text{NEt}_3$  versetzt. Nach 24 h Rühren bei RT wurde das LM im ÖV abgezogen und der Rückstand zweimal mit je 100 ml Essigester extrahiert. Nach zweimaligem Waschen der organischen Phase mit je 75 ml 1M Zitronensäure,  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung (10%) und gesättigter NaCl-Lösung wurde das LM abgezogen. Nach säulenchromatographischer Aufarbeitung ( $\text{SiO}_2$ , Essigester/PE: 5/1-1/3) wurde das Produkt als farbloser Feststoff erhalten.

**$\text{C}_{25}\text{H}_{37}\text{N}_3\text{O}_8$  (507.6)**



**Ausbeute:** 260 mg (0.51 mmol; 60.3%)

**Schmp.:** 99.5°C-100.5°C

**PI-DCIMS ( $\text{NH}_3$ ):**  $m/z$  (%) = 525.4,  $[\text{M}+\text{NH}_4]$  (100).

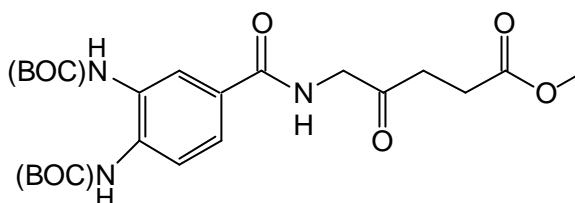
**$^1\text{H-NMR}$**  (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 24°C, TMS):  $\delta$  [ppm] = 1.45 (s, 18H, 2BOC), 2.73 (m, 4H,  $2\text{CH}_2$ ), 3.51 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 4.09-4.31 (m, 3H,  $\text{CH}_2$ , CH), 5.11 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 5.79/7.11 (breites s, 2H, NH), 7.35 (m, 5H, 5CH, aromatisch).

**Elementaranalyse:** [%] ber. C 59.2, H 7.4, N 8.3;

[%] gef. C 60.1, H 7.6, N 7.9.

### 7.12.6 3,4-Di-BOC-diaminobenzoessäure-N-methyl-5-aminolävulinatylamid

Eine Lösung von 352 mg (1 mmol) 3,4-Di-BOC-diaminoaminobenzoessäure in 8 ml DMF wurde innerhalb von 45 min durch Zugabe von 0.82 g (6.1 mmol) N-Hydroxybenzotriazol (HOBt) und 1.16 g (6.1 mmol) EDC aktiviert. Hierzu wurde eine Lösung von 360 mg (2 mmol) ALA-Methylester in 6 ml DMF innerhalb von 10 min zugetropft und anschließend wurde der Reaktionsansatz mit 0.77 ml (5.5 mmol)  $\text{NEt}_3$  versetzt. Nach 24 h Rühren bei RT wurde das LM im ÖV abgezogen und der Rückstand zweimal mit je 100 ml Essigester extrahiert. Nach zweimaligem Waschen der organischen Phase mit je 75 ml 1M Zitronensäure,  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung (10%) und gesättigter NaCl-Lösung wurde das LM abgezogen. Nach säulenchromatographischer Aufarbeitung ( $\text{SiO}_2$ , Essigester/PE: 5/1-1/3) wurde das Produkt als gelblicher, harziger Feststoff isoliert.



**$\text{C}_{23}\text{H}_{33}\text{N}_3\text{O}_8$  (479.5)**

**Ausbeute:** 320 mg (0.67 mmol; 51.3%)

**$^1\text{H-NMR}$**  (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 24°C, TMS):  $\delta$  [ppm] = 1.52 (s, 2BOC, 18H), 2.70/2.82 (AA'BB'-System, 4H, 2CH<sub>2</sub>), 3.69 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 4.39 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 6.59/6.89/7.06 (s, 3H, 3NH), 7.54-7.87 (m, 2H, 2CH, aromatisch), 8.40 (s, 1H, CH, aromatisch).

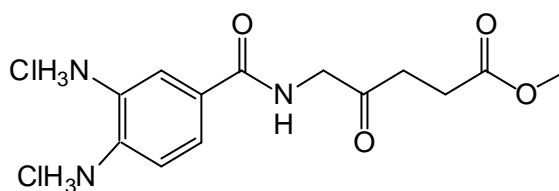
### 7.12.7 3,4-Diaminobenzoessäure-N-methyl-5-aminolävulinatylamid-dihydrochlorid 27

Wie in AAV 5 beschrieben, wurden 119.9 mg (0.25 mmol) 3,4-Di-BOC-diaminobenzoessäure-N-methyl-5-aminolävulinatylamid unter Eiskühlung in 5 ml getrocknetem Essigsäureethylester gelöst und mit 5 ml HCl-gesättigtem Essigsäureethylester versetzt. Nach 30 min wurde das Eisbad entfernt und es wurde 4 h bei RT wei-



tergerührt, wobei eine Trübung der Lösung auftrat. Der farblose Feststoff wurde unter  $N_2$  abfiltriert und nach Umkristallisation (Essigester/PE) im ÖV getrocknet.

**$C_{13}H_{19}Cl_2N_3O_4$  (352.2)**



**Ausbeute:** 78.5 mg (0.22 mmol; 89.2%)

**$^1H$ -NMR** (250 MHz,  $D_2O$ , 24°C, TMS):  $\delta$  [ppm] = 2.58/2.81 (AA'BB'-System, 4H, 2 $CH_2$ ), 3.56 (s, 3H,  $CH_3$ ), 4.21 (s, 2H,  $CH_2$ ), 6.95 (m, 1H, CH, aromatisch), 7.46-7.60 (m, 2H, 2CH, aromatisch).

## 8 Zusammenfassung

Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war es, neue 5-Aminolävulinsäureester für die Photodynamische Tumorthherapie und Tumordiagnostik zu synthetisieren und deren Eigenschaften an *in vitro*-Modellen für die Harnblase und den Gastrointestinaltrakt zu untersuchen. Insgesamt wurden 42 ALA-Ester synthetisiert, wovon 27 zellbiologisch untersucht wurden.

### 8.1 Hintergrund

1991 führten Kennedy und Pottier die Photodynamische Tumorthherapie und Tumordiagnostik mit 5-Aminolävulinsäure (ALA) ein. ALA ist ein körpereigener Stoff, der im Zuge der Häm-Biosynthese in den Zellen aus Glycin und Succinyl-Coenzym A gebildet wird. Im weiteren Verlauf entsteht Protoporphyrin IX (PPIX), aus dem durch Eiseneinlagerung Häm gebildet wird. Aufgrund eines strengen Kontrollmechanismus (Feedback-Kontrolle) werden die Konzentration von freiem Häm geregelt und die intrazelluläre ALA-Synthese limitiert. Durch exogene ALA-Applikation kann dieser Kontrollmechanismus umgangen werden, was zu einer Akkumulation von PPIX im Zielgewebe (Tumor) führt. PPIX stellt einen idealen Photosensibilisator dar, der nach Anregung mit Licht entsprechender Wellenlänge einerseits zur Photodynamischen Tumordiagnostik (PDD) und andererseits zur Photodynamischen Tumorthherapie (PDT) herangezogen werden kann. Bei der PDD nutzt man die selektive Anreicherung von PPIX in entartetem Gewebe. Unter Blaulichtbestrahlung können mittels der charakteristischen Rotfluoreszenz von PPIX Präkanzerosen und Frühkarzinome lokalisiert und von gesundem Gewebe abgegrenzt werden. Damit kommt der Fluoreszenz-Endoskopie mit ALA große Bedeutung bei der Krebsfrüherkennung zu. Bei der PDT wird nach ALA-Applikation und tumorselektiver PPIX-Akkumulation mit Rotlicht bestrahlt. Die Anregungsenergie wird vom Photosensibilisator entweder direkt an Zielmoleküle abgegeben (Photoreaktionen I) oder zur Bildung von Singulett-Sauerstoff herangezogen (Photoreaktionen II). Beide Mechanismen führen zur Zerstörung lebenswichtiger Zellbestandteile. Die Tumorzelle stirbt ab. Heutiger Standard der

PDT in der Onkologie ist die systemische Applikation von Photofrin. Dieser Photosensibilisator reichert sich nur wenig selektiv in Tumoren an, kann nicht topisch appliziert werden und führt zu einer Sensibilisierung der Patienten gegenüber Sonnenlicht für mehrere Wochen. ALA-induziertes PPIX weist neben einer sehr hohen Tumorselektivität keinerlei Dunkeltoxizität auf. Aufgrund rascher Eliminierung aus dem Körper (24 Stunden) kommt es zu einer sehr geringen Photosensibilisierung. Somit stellt die ALA-PDT eine sehr schonende und effektive Methode zur Tumorthherapie dar.

Aufgrund der geringen Lipophilie von ALA ist die Aufnahme durch die Zellmembran und die damit verbundene intrazelluläre PPIX-Akkumulation limitiert. Eine Möglichkeit, die Lipophilie von ALA zu steigern, stellt die Synthese von ALA-Estern dar. Die Verwendung von ALA-Estern führt zu einer schnelleren intrazellulären Aufnahme und bewirkt eine drastische Steigerung der PPIX-Akkumulation im Vergleich zur freien Säure. Auf der Suche nach idealen Esterstrukturen sind zwei Faktoren von entscheidender Bedeutung: die intrazelluläre Aufnahme und die enzymatischen Folgeschritte auf dem Weg der PPIX-Synthese. Das Derivat muss möglichst rasch durch die Zellmembran gelangen, um nach kurzer Zeit hohe intrazelluläre Konzentrationen zu erzielen. Andererseits ist eine schnelle intrazelluläre Hydrolyse der ALA-Derivate durch Esterasen notwendig, um die PPIX-Biosynthese in Gang zu setzen. Die Summe der beiden entscheidenden Prozesse, der zellulären Aufnahme und der enzymatischen Folgeschritte, kann durch die PPIX-Fluoreszenzmessung ermittelt werden.

Neben der PDT der Haut ist die PDD und PDT des GIT sowie der Harnblase Gegenstand aktueller Forschung. Für die Anwendung im Gastrointestinaltrakt und in der Harnblase haben sich der ALA-Hexylester und der ALA-Benzylester als wirksamste Verbindung herausgestellt. Diese Systeme gilt es zu verbessern.

## 8.2 Synthese

Ausgehend von der in vielen *in vitro*- und *in vivo*-Tests erfolgreichen Hexylester- und Benzylestergrundstruktur wurden neue ALA-Ester synthetisiert und zellbiologisch untersucht. Je nach verwendetem Alkohol kamen zwei unterschiedliche Synthesewege zur Anwendung. In einer einstufigen Reaktion wurde 5-Aminolävulinsäurehydrochlorid **1** in einem Überschuss Alkohol gelöst bzw. suspendiert und unter Eis-

kühlung Thionylchlorid zugetropft. Nach dreistündigem Erhitzen und Abziehen des überschüssigen Alkohols wurden die Ester **2-9** durch Umkristallisation gereinigt (Abb. 38).

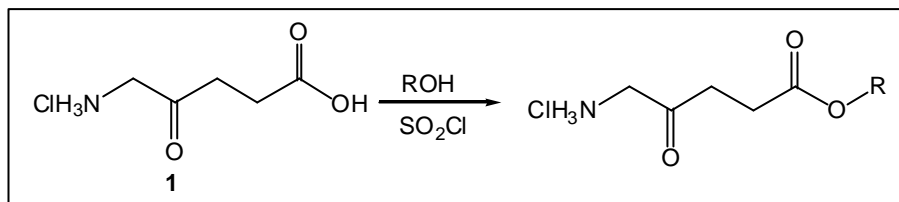


Abbildung 38: Synthese der ALA-Ester **2-9**

Bei zu geringer Löslichkeit von 5-Aminolävulinsäure-hydrochlorid **1** im Alkohol bzw. bei Verwendung fester Alkohole konnte mit Thionylchlorid keine Veresterung beobachtet werden. Um eine systematische Synthese von ALA-Estern zu gewährleisten, kam eine neue Synthesestrategie zum Einsatz. In einer dreistufigen Synthese wurde zunächst die Aminofunktion von ALA mit einer BOC-Schutzgruppe versehen. Nach chromatographischer Reinigung wurde die geschützte Verbindung mit dem entsprechenden Alkohol mittels EDC-Kupplung verestert und das Produkt chromatographisch gereinigt. Nach Entfernen der BOC-Schutzgruppe mittels einer HCl-gesättigten Ethylacetatlösung fielen die Ester **12-26** in Form von farblosen, gut wasserlöslichen Pulvern an (Abb. 39).

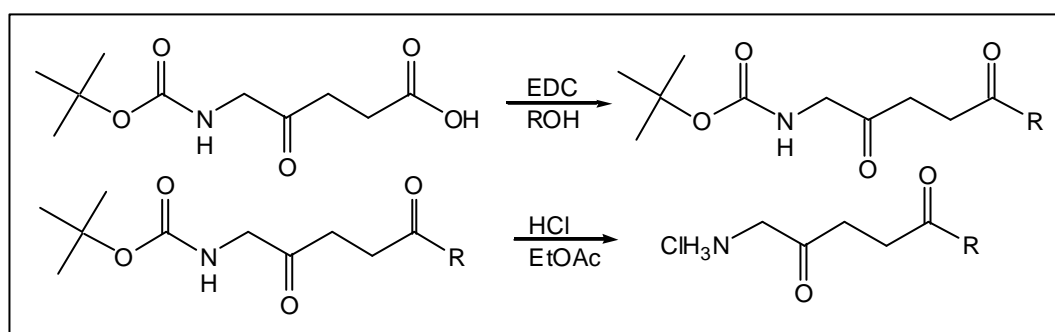


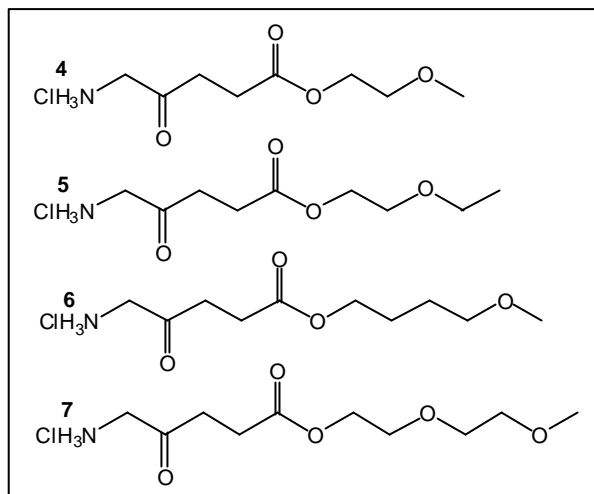
Abbildung 39: ALA-Derivate **12-26**

Weiterhin wurden durch Kupplung von geschützten Diaminosäuren mit ALA-Estern entsprechende ALA-Diaminoderivate erhalten.

Die synthetisierten ALA-Derivate lassen sich in unterschiedliche Klassen einteilen:

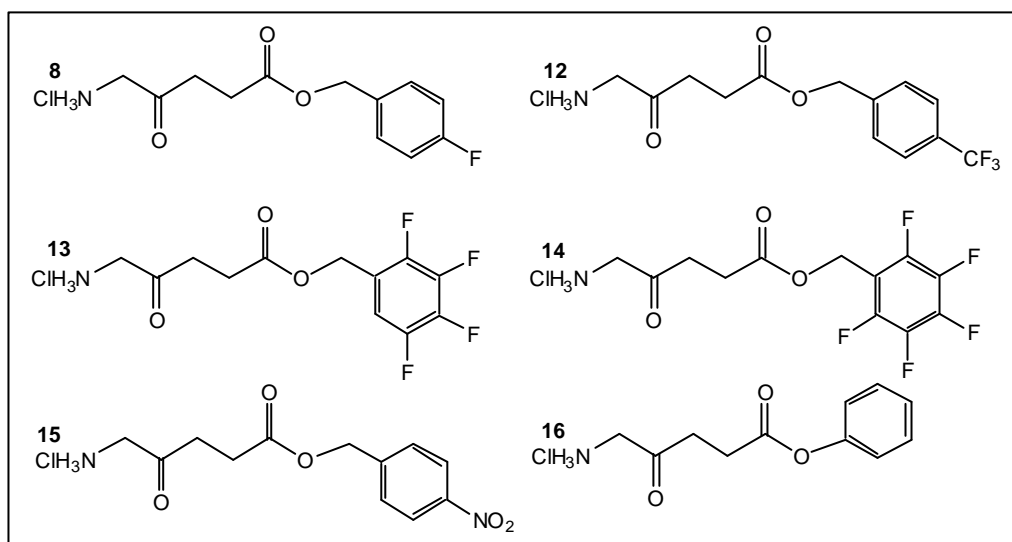
**ALA-Oxaalkylester 4-7:**

- Ausgehend vom ALA-Hexylester **2** wurden Oxaalkylketten verschiedener Länge mit unterschiedlichem Verhältnis unpolarer CH<sub>2</sub>-Gruppen und polarer Sauerstoffatome (C/O: 2,5, 3, 4, 5) an ALA geknüpft, um eine Steigerung der Membranpermeabilität und der damit verbundenen PPIX-Akkumulation zu erzielen



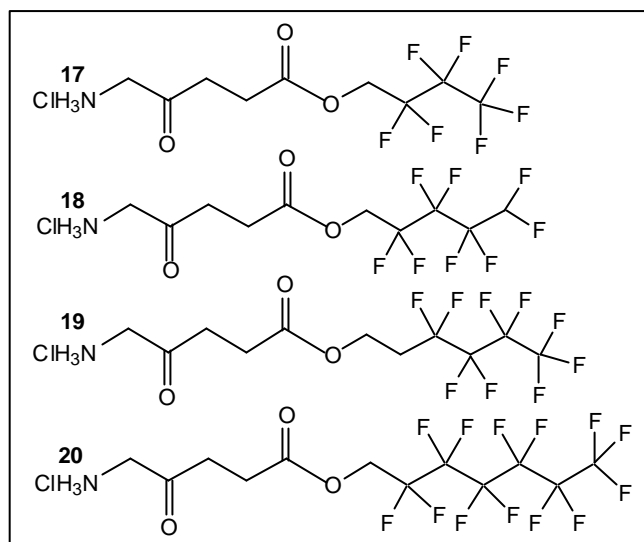
**Substituierte ALA-Benzylester 8, 12-15 und ALA-Phenylester 16:**

- Ausgehend vom ALA-Benzylester **3** wurden aktivierte ALA-Benzylester mit unterschiedlichen elektronenziehenden Gruppen (F, CF<sub>3</sub>, 4xF, 5xF, NO<sub>2</sub>) synthetisiert, um den Substituenteneinfluss auf die PPIX-Produktion zu untersuchen.

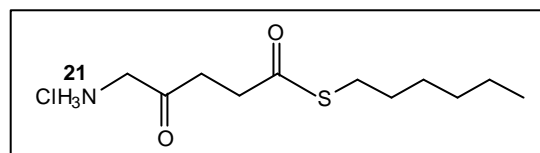


Fluorierte ALA-Alkylester **17-20**:

- ALA wurde mit geradkettigen Alkoholen unterschiedlichen Fluorierungsgrads und unterschiedlicher Kettenlänge ( $C_4H_2F_7$ ,  $C_5H_3F_8$ ,  $C_6H_4F_9$ ,  $C_7H_2F_{13}$ ) verestert. Die elektronenziehenden Substituenten sollten eine Aktivierung der Esterbindung und somit eine raschere PPIX-Produktion bewirken.

ALA-Thioester **21**:

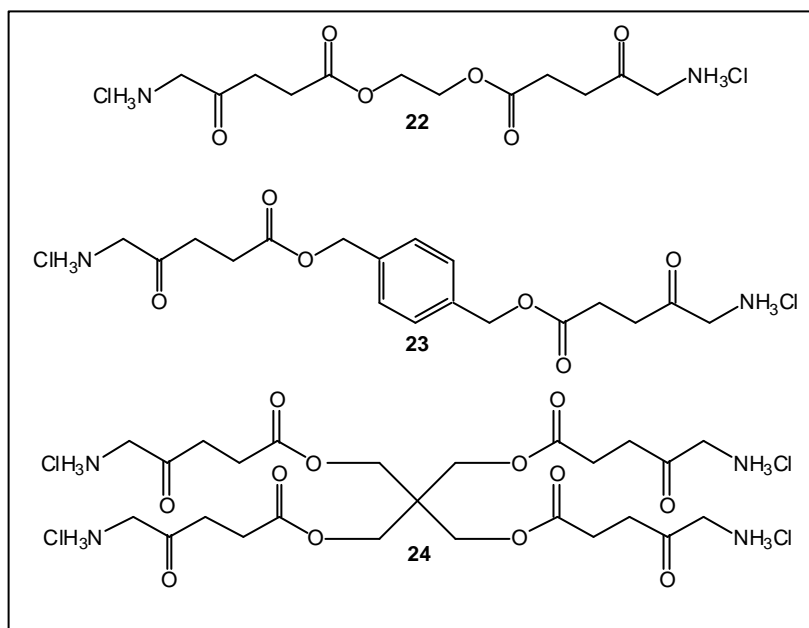
- Es wurde der dem Hexylester analoge ALA-Thiohexylester synthetisiert. Nach enzymatischer



Hydrolyse könnte das freiwerdende Thiol zu einer Aktivierung der ALA-Dehydrogenase und somit zu einer Steigerung der PPIX-Akkumulation führen.

ALA-Oligoester **22-24**:

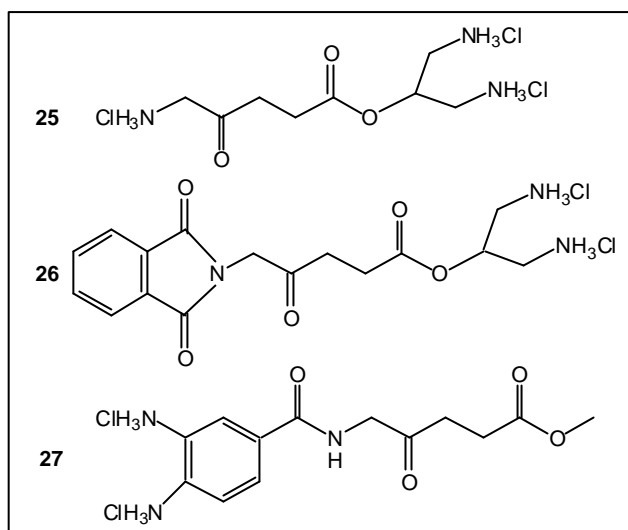
- Weiterhin wurde die Idee verfolgt, in einer Struktur mehrere ALA-Moleküle anzuhäufen, um nach intrazellulärer Hydrolyse mehrere ALA-Einheiten zur PPIX-Biosynthese zur Verfügung zu stellen. Als Alko-



holbrücken dienten neben Glykol in Analogie zum Benzylester der 1,4-Dibenzylalkohol sowie als einfache Tetrahydroxyverbindung Pentaerythrit.

**ALA-Diaminoderivate 25-27:**

- Diaminokomponenten wurden über Ester- bzw. Amidbindungen an ALA geknüpft. Nach enzymatischer Hydrolyse könnten die freigesetzten Diaminofragmente als Eisen-Komplexbildner dienen und eine Steigerung der PPIX-Produktion bewirken.



### 8.3 Zellbiologische Untersuchungen

In einem durchflusszytometrischen Screening wurden die esterinduzierte PPIX-Akkumulation (0.12 mmol/l; 3 h) in J82 und HT29 bestimmt und anschließend die Dunkeltoxizität mittels MTT-Test gemessen. Des Weiteren wurde die Tumorselektivität (PPIX-Akkumulation in J82/URO TSA, HT29/CCD18; 0.12 mmol/l, 3 h) und die Phototoxizität der effektivsten Verbindungen bestimmt (Klonogenitätstest nach Bestrahlung: 590-700 nm, 0-30 J/cm<sup>2</sup>; J82/URO TSA, HT29/CCD18; 0.12 mmol/l, 3 h).

#### 8.3.1 *In vitro*-Modelle

Die *in vitro*-Forschung setzt eine gründliche Auswahl und eine sinnvolle Kombination der eingesetzten Zelllinien voraus. Der Vergleich zwischen Tumor und normalem Gewebe ist besonders in der Krebsforschung von entscheidender Bedeutung. In der aktuellen Literatur werden im Bereich der PDT und der PDD häufig neue Photosensibilisatoren nur an einer Tumorzelllinie ohne Vergleich mit einer normalen Zelllinie getestet. Ohne Beweis ausreichender Tumorselektivität sind Aussagen über die Effektivität neuer Verbindungen für die PDT und die PDD nicht aussagekräftig. Die Auswahl ei-

ner Zelllinie zur Repräsentation des Normalgewebes ist oftmals nicht einfach, da Zelllinien aus Normalgewebe sehr viel schlechter zu etablieren und zu kultivieren sind als solche aus Tumorgewebe.

Einen sehr aktuellen und vielversprechenden Ansatz zu Tumorthherapie und Tumordiagnostik stellen die PDT und die PPD des Gastrointestinaltrakts und der Harnblase dar. Die vorliegenden zellbiologischen Experimente wurden an zwei verschiedenen *in vitro*-Modellen durchgeführt. Als Modell für die Harnblase diente die aus einem invasiven Urothelkarzinom stammende Karzinomzelllinie J82 mit niedrigem Differenzierungsgrad [G3]. Normale urotheliale Zellen wurden durch die Zelllinie UROTSA repräsentiert, welche aus normalem Urothel entnommen und durch Virus-Transformation immortalisiert wurde<sup>[75]</sup>. Als *in vitro*-Modell des Gastrointestinaltrakts dienten wiederum zwei humane Zelllinien. Die mittelgradig differenzierte Zelllinie HT29 [G2] wurde aus dem kolorektalen Adenokarzinom einer 44-jährigen kaukasischen Patientin isoliert. Da Kolonepithelzelllinien nicht kommerziell erhältlich sind, diente als Phänotyp des normalen Kolons die Kolonfibroblastenlinie CCD18, die aus dem Kolonresektat eines 2.5 Monate alten Mädchens etabliert wurde. Die Verwendung der Fibroblasten als Vertreter des normalen Kolongewebes ist vertretbar, da *in vivo* die Bindegewebsschicht nur durch eine epitheliale Einzelschicht bedeckt wird. Somit wäre eine PPIX-Fluoreszenz des Bindegewebes bei der PDD sichtbar und eine PPIX-Akkumulation in den Fibroblasten würde bei der PDT zu schwerwiegenden Schädigungen des Bindegewebes führen.

### 8.3.2 Durchflusszytometrisches Screening

Hohe PPIX-Level sind eine Grundvoraussetzung für die Anwendung in der PDD und speziell in der PDT. In einem durchflusszytometrischen Screening wurde die PPIX-Akkumulation der Verbindungen **1-27** untersucht.

Eine Derivatisierung am Stickstoff der 5-Aminolävulinsäure führt in den verwendeten Zelllinien zu einer extrem geringen PPIX-Akkumulation. Diese Tendenz wird durch Experimente von Klock et al.<sup>[43]</sup> und Casas et al.<sup>[76]</sup> an verschiedenen Zelllinien mit



unterschiedlichen N-substituierten ALA-Derivaten bestätigt Ursache hierfür könnte ein Mangel an unspezifischen intrazellulären Amidasen sein.

Das Anbringen von Oxaalkylketten an ALA führt nicht zu der gewünschten Steigerung der PPIX-Akkumulation. Durch die Einführung von elektronenziehenden Substituenten dagegen kann die PPIX-Akkumulation sowohl des Hexylesters als auch des Benzylesters deutlich gesteigert werden. Speziell der Nonafluorhexylester induziert ein deutlich höheres PPIX-Niveau als der Hexylester und Benzylester in beiden getesteten *in vitro*-Modellen. Ursache hierfür könnte eine leichtere und schnellere Hydrolyse der durch die Fluorsubstituenten aktivierten Esterbindung sein.

Die synthetisierten ALA-Oligoester zeigten eine sehr unterschiedliche PPIX-Akkumulation. Entscheidend für die Effektivität ist nicht die Anzahl der gebundenen ALA-Einheiten. Der vier ALA-Einheiten enthaltende Tetraester induziert mit Abstand die geringste PPIX-Akkumulation. Möglicherweise ist die Aufnahme durch die Membran bzw. die Esterhydrolyse in der Zelle aufgrund des größeren sterischen Anspruchs im Vergleich zu den Diestern erschwert. Der Ethylenglykoldiester erzeugt eine deutlich geringere PPIX-Induktion als der Dibenzylester, der eine signifikant höhere PPIX-Konzentration im Vergleich zum Hexylester und Benzylester erzeugt.

Des Weiteren weist der ALA-Thiohexylester eine deutlich höhere PPIX-Anreicherung als der analoge Hexylester auf, was auf die Aktivierung der ALA-Dehydrogenase durch das intrazellulär abgespaltene Thiol zurückzuführen sein könnte.

Die neuen Verbindungen **19**, **21** und **23** führten zu einer deutlichen Steigerung der PPIX-Akkumulation im Vergleich zum Hexylester **2** um bis zu 62% in HT29 (Kolon) und bis zu 27% in J82 (Urothel).

### 8.3.3 Tumorselektive PPIX-Akkumulation und Phototoxizität

Die Tumorselektivität der PPIX-Akkumulation ist die wichtigste Eigenschaft für die PDD und PDT, um eine exakte Diagnostik und eine schonende Therapie zu gewährleisten. Mit den neuen Estern **19**, **21** und **23** konnte die tumorselektive PPIX-Akkumulation im Vergleich zum Hexylester im Kolon (HT29/CCD18) um bis zu 47% und im Urothel (J82/URO TSA) um bis zu 17% gesteigert werden.

In der PDT soll bei der Bestrahlung der Tumor möglichst vollständig zerstört und gleichzeitig das gesunde Gewebe maximal geschont werden. Um dies zu gewährleisten, sind große Unterschiede in den LD<sub>50</sub>-Werten zwischen krankem und gesundem Gewebe erforderlich. Ein geringes LD<sub>50</sub>-Verhältnis zwischen Tumor- und Normalgewebe (niedriges LD<sub>50</sub>-Niveau in den Tumorzellen, hohes LD<sub>50</sub>-Niveau in den normalen Zellen) ist wünschenswert. Die Verwendung der drei neuen Ester führte bei Phototoxizitätstests zu einer Erniedrigung des LD<sub>50</sub>-Verhältnisses im Vergleich zum Hexylester um bis zu 68% Kolon (HT29/CCD18) und um bis zu 15% im Urothel (J82/URO TSA).

## 8.4 Fazit

Die Photodynamische Therapie und Diagnostik mit 5-Aminolävulinsäure ist ein aktueller und sehr vielversprechender Ansatz zur exakten Diagnostik und schonenden Behandlung von Tumorerkrankungen. Die hohe Tumorselektivität der PPIX-Akkumulation und die geringe Verweildauer im Körper ermöglichen eine effektive Behandlung bei maximaler Schonung des umgebenden Normalgewebes und ist der entscheidende Vorteil gegenüber der Verwendung von Zytostatika oder anderen Photosensibilisatoren. In Anbetracht des enormen Wachstums des PDT-Markts mit prognostizierten Umsätzen von bis zu einer Milliarde Euro sowie des großen Potenzials der PDD im Rahmen der Tumordiagnostik ist die Entwicklung neuer Photosensibilisatoren zudem von großem wirtschaftlichen Interesse.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine dreistufige Sequenz für die systematische Synthese von ALA-Estern etabliert. Hierdurch konnte eine Reihe neuer wasserlöslicher ALA-Derivate in guten Ausbeuten erhalten werden. Die Verbindungen zeigten keinerlei Dunkeltoxizität. Die diagnostischen und therapeutischen Eigenschaften (PPIX-Akkumulation, Phototoxizität) von ALA-Hexylester **2** konnten in den getesteten *in vitro*-Modellen für die Harnblase und den Gastrointestinaltrakt durch die neuen Verbindungen 5-Aminolävulinsäure-1H,1H,2H,2H-nonafluorhexylester-hydrochlorid **19**, 5-Aminolävulinsäurethiohexylester-hydrochlorid **21** und Bis-5-aminolävulinsäure-1,4-dibenzyl-diester-dihydrochlorid **23** deutlich verbessert werden. In Planung stehende *in*

*vivo*-Experimente der neuen Substanzen an einem Rattenmodell stellen den nächsten Schritt auf dem Weg zur klinischen Anwendung dar.

## 9 Literaturverzeichnis

- [1] N. Becker, R. Frentzel-Beyme, G. Wagner, *Krebsatlas der Bundesrepublik Deutschland*, Springer-Verlag, Berlin, **1989**.
- [2] *Römpp Chemie Lexikon*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, **1995**.
- [3] D. M. Prescott, A. S. Flexer, *Krebs (Fehlsteuerung von Zellen, Ursachen und Konsequenzen)*, Spektrum der Wissenschaft-Verlagsgesellschaft, Heidelberg, **1990**.
- [4] Der Deutsche Krebsatlas, Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg (dkfz): [www.dkfz-heidelberg.de](http://www.dkfz-heidelberg.de).
- [5] Krebsinformationsdienst (KID), Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg (dkfz): [www.krebsinformation.de](http://www.krebsinformation.de).
- [6] H. Greim, E. Deml, *Toxikologie*, VCH, Weinheim, New York, Basel, Cambridge, Tokyo, **1996**, S. 135.
- [7] E.-M. de Villiers, in *Krebsforschung heute* (Berichte aus dem Deutschen Krebsforschungszentrum) (Hrsg. Deutsches Krebsforschungszentrum), Steinkopff, Darmstadt, **1995**, S. 142.
- [8] Der Deutsche Krebsatlas: Krebsmortalität nach Organen, Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg: [www.dkfz-heidelberg.de](http://www.dkfz-heidelberg.de).
- [9] Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg: [www.Krebsinformation.de/krebsvorbeugung.html](http://www.Krebsinformation.de/krebsvorbeugung.html).
- [10] a) C. S. Foote, *Photochem. Photobiol.* **1991**, 54, 659.  
b) C. Lin, *Cancer Cells* 3, **1991**, 437.  
c) T. Takemura, S. Nakajima, I. Sakata, *Photochem. Photobiol.* **1994**, 59, 366.
- [11] O. Raab, *Z. Biol.* **1900**, 39, 524.
- [12] H. Tappeneiner, A. Jesoniek, *Münch. Med. Wochenschr.* **1903**, 47, 2042.
- [13] E. Meyer-Betz, *Arch. Dtsch. Klin. Med.* **1913**, 112, 476.
- [14] H. Auler, G. Banzer, *Z. Krebsforsch.* **1942**, 53, 65.

- 
- [15] F. H. J. Figge, G. S. Weiland, L. O. J. Maganiello, *Roy. Soc. Exp. Biol. Med.* **1948**, 68, 640.
- [16] R. L. Lipson, F. J. Blades, A. M. Olsen, *J. Natl. Cancer Inst.* **1961**, 26, 1.
- [17] T. J. Dougherty, *Photochem. Photobiol.* **1987**, 45, 879.
- [18] R. Krieg, S. Fickweiler, O. Wolfbeis, R. Knüchel, *Photochem. Photobiol.* **2000**, 72, 226.
- [19] L. Milgrom, S. Mac Robert, *Chem. Br.* **1998**, 34, 45.
- [20] a) L. K. Lee, C. Whitehurst, M. L. Pantelides, J. V. Moore, *Photochem. Photobiol.* **1995**, 62, 882.  
b) J. G. Moser in *Photodynamic Tumor Therapy* (Hrsg. J. G. Moser), Harwood Academic Publisher, Amsterdam, **1998**.
- [21] D. Dolphin, *Can. J. Chem.* **1994**, 72, 1005.
- [22] a) D. Wöhrle, M. W. Tauscher, W.-D. Stohrer, *Photochemie - Konzepte, Methoden, Experimente*, Wiley-VCH, New York, Chichester, Weinheim, Brisbane, Singapore, **1998**.  
b) B. Roeder in *Photodynamic Tumor Therapy* (Hrsg. J. G. Moser), Harwood Academic Publisher, Amsterdam, **1998**.
- [23] J. Cadet, M. Berger, C. Decarroz, J. R. Wagner, J. E. van Lier, Y. M. Ginot, P. Viny, *Biochimie* **1986**, 68, 813.
- [24] L. Stryer, *Biochemie*, 2. korr. Nachdruck der völlig Neubearb. Aufl., Akad. Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford, **1994**.
- [25] R. Krieg, *Diplomarbeit*, Universität Regensburg, **1998**.
- [26] K.-C. Barth, *Diplomarbeit*, Universität Regensburg, **1998**.
- [27] a) H. I. Pass, *J. Natl. Cancer Inst.* **1993**, 85, 443.  
b) J. C. Kennedy, R. H. Pottier, D. C. Pross, *Photochem. Photobiol.* **1990**, 6, 143.
- [28] Z. Malik, H. Lugaci, *Brit. J. Cancer* **1987**, 56, 589.

- 
- [29] Q. Peng, K. Berg, J. Moan, M. Kongshaug, J. M. Nesland, *Photochem. Photobiol.* **1997**, *65*, 235.
- [30] A. Hirth, U. Michelsen, D. Wöhrle, *Chemie in unserer Zeit* **1999**, *32*, 84.
- [31] Photocure ASA: <http://www.photocure.com>.
- [32] R. M. Szeimies, M. Landthaler, *Blick in die Wissenschaft* **1994**, *22*.
- [33] a) H. Messmann, F. Kullmann, T. Wild, R. Knüchel-Clarke, J. Rüschhoff, V. Gross, J. Schölmerich, A. Holstege, *Endoscopy* **1998**, *30*, 333.  
b) H. Messmann, R. Knüchel, E. Endlicher, T. Hauser, R. M. Szeimies, F. Kullmann, W. Bäuml, J. Schölmerich, *Dtsch. med. Wschr.* **1998**, *123*, 515.
- [34] J. C. Kennedy, R. H. Pottier, R. L. Reid, *PCT Int. Appl.* **1991**, *WO 91/01727*.
- [35] [www.dusapharma.com](http://www.dusapharma.com).
- [36] a) K. E. Giersckky, J. Moan, Q. Peng, H. Steen, T. Warloe, A. Bjorseth, *PCT Int. Appl.* **1996**, *WO 96/28412*.  
b) J. Klaveness, N. O. Nilsen, J. E. Braenden, A. Godal, *PCT Int. Appl.* **2002**, *WO 02/10120*.
- [37] E. Heinemann, *Solide Tumoren (Therapie-Leitlinien der Internistischen Onkologie)* (Hrsg.: Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie), W. Zuckschwerdt-Verlag München, Wien, New York, **1996**.
- [38] [www.krebs-kompass.de](http://www.krebs-kompass.de).
- [39] S. Eleouet, N. Rousset, J. Carre, I. Bourre, V. Vonarx, Y. Lajat, G. M. J. Beijersbergen van Henegouwen, T. Patrice, *Photochem. Photobiol.* **2000**, *71*, 447.
- [40] J.-M. Gaullier, K. Berg, Q. Peng, H. Anholt, P. K. Selbo, W. Ma, J. Moan, *Cancer Research* **1997**, *57*, 1481.
- [41] Q. Peng, T. Warloe, J. Moan, H. Heyerdahl, H. Steen, K. E. Giercksky, J. M. Nesland, *Photochem. Photobiol.* **1995**, *61*.
- [42] Q. Peng, J. Moan, V. Iani, H. B. Steen, A. Bjorseth, J. M. Nesland, *Photochem. Photobiol. B Biol.* **1996**, *34*, 95.

- 
- [43] J. Kloek, G. M. J. Beijersbergen van Henegouwen, *Photochem. Photobiol.* **1996**, *64*, 994.
- [44] Q. Peng, T. Warloe, K. Berg, J. Moan, M. Kongshaug, K. E. Giercksky, J. M. Nesland, *Cancer* **1997**, *79*, 2282.
- [45] D. I. Vernon, Vortrag: *Mechanisms of cellular uptake of ALA esters, Fourth International Workshop on ALA-based PDT and Photodetection*, Leeds **2002**.
- [46] J. Kloek, W. Akkermans, G. M. J. Beijersbergen van Henegouwen, *Photochem. Photobiol.* **1998**, *67*, 150.
- [47] E. Rud, O. Gederaas, A. Hogset, K. Berg, *Photochem. Photobiol.* **2000**, *71*, 640.
- [48] D. Hückel, *Dissertation*, Universität Bremen, **1979**.
- [49] E. L. Taylor, D. I. Vernon, J. Schonfield, J. Griffiths, S. B. Brown, *Kongressbeitrag* **1999**, Centre for Photobiology and Photodynamic Therapy, University of Leeds.
- [50] H. Takeya, *Chem. Abstr.* *116*, **1992**, P189633.
- [51] Y. Berg, A. Greppi, A. O. Siri, R. Neier, L. Juillerat-Jeanneret, *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 4738.
- [52] T. Ebate, H. Kawakami, K. Matsumoto, K. Koseki, H. Matsushita, *Eur. Pat. Appl.* **1992**, EP 483714 A1.
- [53] R. Brückner, *Reaktionsmechanismen*, Spektrum Akad. Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford, **1996**.
- [54] F. S. Gibson, S. C. Bergmeier, H. Rapoport, *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 3216.
- [55] M. K. Dhaon, R. K. Olson, K. Ramasamy, *J. Org. Chem.* **1982**, *47*, 1962.
- [56] S. H. Battah, C.-E. Chee, H. Nakanishi, S. Gerscher, *Bioconjugate Chem.* **2001**, *12*, 980.
- [57] A. Curnow, B. W. Mc Ilroy, M. J. Postle-Hacon, J. B. Porter, A. J. MacRoberts, S. G. Bown, *Brit. J. Cancer* **1998**, *78*, 1278.
- [58] K. Berg, H. Anholt, O. Bech, J. Moan, *Brit. J. Cancer* **1996**, *74*, 688.

- 
- [59] K.-C. Barth, *Dissertation*, Universität Regensburg, **2001**.
- [60] E. Wünsch in *Methoden der Organischen Chemie (Houben-Weyl)* 4. Aufl., Band 15/I, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, **1974**, 117.
- [61] E. Breitmaier, G. Jung, *Organische Chemie I*, 2. Aufl., Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, **1986**, 474.
- [62] D. H. Williams, I. Flemming, *Strukturaufklärung in der organischen Chemie*, 6. überarb. Aufl., Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, **1991**.
- [63] M. Hesse, H. Meier, B. Zeeh, *Spektroskopische Methoden in der Organischen Chemie*, 4. Aufl., Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, **1991**.
- [64] T. Lindl, *Zell- und Gewebekultur: Einführung in die Grundlagen sowie ausgewählte Methoden und Anwendungen*, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, New York, **1989**.
- [65] H. Kleinig, P. Sitte, *Zellbiologie: Ein Lehrbuch*, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, New York, **1992**.
- [66] R. Knüchel, *Pathologe* **1994**, 15, 1.
- [67] R. Krieg, *Dissertation*, Universität Regensburg, **2001**.
- [68] R. Krieg, S. Fickweiler, O. S. Wolfbeis, R. Knüchel, *Photochem. Photobiol.* **2000**, 72, 226.
- [69] T. Mosmann, *J. Immunol. Methods* **1983**, 65, 55.
- [70] A. A. Lehninger, *Biochemie*, Verlag Chemie, Weinheim, **1979**.
- [71] B. C. Wilson, M. Olivio, G. Singh, *Photochem. Photobiol.* **1997**, 65, 166.
- [72] H. Brunner, F. Hausmann, R. Krieg, E. Endlicher, J. Schölmerich, R. Knuechel, H. Messmann, *Photochem. Photobiol.* **2001**, 74, 712.
- [73] F. Hausmann, *Diplomarbeit*, Universität Regensburg, **2000**.
- [74] E. Endlicher, P. Rümmele, F. Hausmann, R. Krieg, R. Knüchel, H. C. Rath, J. Schölmerich, H. Messmann, *Brit. J. Cancer* **2001**, 85, 1572.



- 
- [75] M. R. Rossi, J. R. Masters, S. Park, J. H. Todd, S. H. Garrett, M. A. Sens, S. Somji, J. Nath, D. A. Sens, *Environ. Health Perspect.* **2001**, *109*, 801.
- [76] A. Casas, C. Battle, A. R. Butler, D. Robertson, E. H. Brown, A. MacRoberts, P. A. Riley, *Brit. J. Cancer* **1999**, *80*, 1525.

## 10 Dank

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Lehrstuhls für das angenehme Arbeitsklima und ihre stete Hilfsbereitschaft bedanken.

Mein besonderer Dank gilt:

Herrn Prof Dr. F. Hofstädter (Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Regensburg) für die Möglichkeit die zellbiologischen Untersuchungen an seinem Institut durchführen zu können.

Herrn PD Dr. H. Messmann (III. Medizinische Klinik, Zentralklinikum Augsburg) und Frau Dr. E. Endlicher (Klinik und Poliklinik für Innere Medizin I, Universitätsklinikum Regensburg) für die gute Zusammenarbeit im Bereich PDD im Gastrointestinaltrakt.

Herrn Dr. R. Krieg für die gute Einarbeitung in die zellbiologischen Arbeitstechniken.

Meinen Laborkollegen Herrn C. Zettler und Frau B. Treitinger für das angenehme Laborklima und die stete Bereitschaft zu fachlichen und privaten Gesprächen.

Herrn Dr. T. Burgemeister, Herrn F. Kastner, Frau N. Pustet, Frau A. Schramm, Frau G. Stühler und Frau R. Brunner-Ploss für die Aufnahme zahlreicher NMR-Spektren.

Herrn G. Wandiger, Herrn H. Schüller und Frau S. Stempfhuber für die Durchführung der Elementaranalysen.

Herrn Dr. K. K. Mayer, Herrn J. Kiermeier und Herrn W. Söllner für die Aufnahme der Massenspektren.

Herrn Dr. K.-C. Barth und Herrn N. Gruber für unseren gemeinsamen synthetischen Weg zu neuen Wirkstoffen.

Mein außerordentlicher Dank gebührt meinen Eltern und Geschwistern für ihre Unterstützung und ihren Rückhalt im Laufe meiner universitären Ausbildung.

Ganz besonders möchte ich mich bei meiner Freundin Marion für ihre Geduld und ihre Liebe bedanken.